



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E ANÁLISE DO PARASITISMO
GASTROINTESTINAL DO BURRO DE MIRANDA (*Equus asinus*) EM SISTEMA DE
PASTOREIO LIVRE**

MARIANA YUAN RIBEIRO COUTO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel dos Anjos Ferreira
Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Sofia Gonçalves Santos

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E ANÁLISE DO PARASITISMO
GASTROINTESTINAL DO BURRO DE MIRANDA (*EQUUS ASINUS*) EM SISTEMA DE
PASTOREIO LIVRE**

MARIANA YUAN RIBEIRO COUTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel dos Anjos Ferreira
Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
CO-ORIENTADOR
Doutora Ana Sofia Gonçalves Santos

2014

LISBOA

“Las reglas matemáticas no bastan para <comprender> la hierba. Es preciso cierta capacidad de <sentir>. No solamente <pastar es un arte>, sino que, generalmente todos los problemas pratenses precisan menos de intelecto que de <olfato>, ese olfato que tan marcadamente poseen los pastores.”

André Voisin, (1974). In *Dinâmica de los pastos*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, por ter aceitado orientar o meu estágio, no qual agradeço todas as conversas inspiradoras que me foram guiando este último ano, até à escolha do tema de tese, a sua simpatia, incentivo e paciência para a minha desorganização aparente, pelo apoio prático laboratorial e pela ajuda bibliográfica.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Sofia Santos, pela amizade, convicção e disponibilidade, pela orientação crítica e apoio de todo o trabalho prático desenvolvido. Obrigada por me teres despertado o gosto pela investigação no campo!

Ao Professor Miguel Quaresma, pela partilha de conhecimentos sobre a situação actual do Burro de Miranda e possíveis linhas de estudo visto o entorno sócio-económico que caracteriza a região.

Ao Professor Doutor Rui Caldeira, pela disponibilidade e esclarecimentos, e por me facultar o contacto da Professora Doutora Ana Sofia Santos.

À AEPGA, à equipa de veterinários, Dr. Miguel Nóvoa e Dr. Jesus Buil, pelos ensinamentos transmitidos ao longo dos seis meses de estágio, pela paciência, incentivo e ideias na busca do tema de tese. Obrigado, por me terem permitido e apoiado a realização do meu trabalho. À Joana Braga, à Cláudia Costa (a grande fotografa!), à Teresa Nóvoa, ao Nuno Martins, ao Manuel Campeão, José Pereira e a todos que lá passaram, por tudo o que me ensinaram e transmitiram, amantes e revitalizantes do mundo rural, mudaram o sentido da minha vida.

Ao Dr. Sérgio Sousa da EUVG, por me ter facultado mais dados para enriquecer o meu trabalho, e pela troca de experiências transmontanas acompanhadas com boas conversas.

Ao Professor Doutor Luís Ferreira da UTAD, pelos conhecimentos, disponibilidade, elasticidade prática e por todo o apoio estatístico, tão imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À equipa do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-UL, por toda a disponibilidade e pela fonte de conhecimentos que floresce nesse laboratório. Em especial à Dra. Lídia Gomes, pela boa disposição e ensinamentos, e a todos os estagiários.

À equipa laboratorial do Departamento de Produção Animal da UTAD, pelos ensinamentos e disponibilidade na análise de todas as amostras, que foram fulcrais para a realização deste trabalho.

A toda a minha família, as pessoas mais importantes para mim. Pelo apoio incondicional, constante incentivo e todos os conhecimentos que ainda me transmitem. Pela Liberdade! Em especial ao meu pai, mãe, irmão, irmã e tia Isabel por me oferecer um tecto em Lisboa.

A toda a família de Lisboa, com quem tive a sorte de partilhar e crescer estes anos. Em especial à Carla, Sharon, Andreia, Margarida e Vânia, pela amizade desenrolada desde o primeiro dia que entrei nesta faculdade. Ao Zdigas, ao Zé da Madeira, à Joana Lopes e à Beta que me acompanharam nesta fase final, onde o apoio mútuo foi imprescindível. À Lucía, Hélène e Alfredo pela amizade transfronteira onde tornaram todos os sonhos possíveis. Desejo-vos a maior sorte do mundo para esta nova etapa das nossas vidas!

Ao Juan, pelo apoio incondicional, por me mostrar a simplicidade da vida e que a convicção faz o sonho ser real! Obrigada pela amizade, humor, e viagens à Natureza!

E todos os meus amigos da vida, o que sou hoje são uma pequena parte de todos vós.

Obrigado a todos!

*“Quando eu morrer batam em latas,
Rompam aos berros e aos pinotes –
Façam estalar no chão chicotes,
Chamem palhaços e acrobatas.*

*Que o meu caixão vá sobre um burro
Ajaezado à andaluza:
A um morto nada se recusa,
E eu quero por força ir de burro...”*
Mário Sá Carneiro, (1916). Paris



ESTUDO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E ANÁLISE DO PARASITISMO GASTROINTESTINAL DO BURRO DE MIRANDA (*Equus asinus*) EM SISTEMA DE PASTOREIO LIVRE

Resumo

A rotina do burro de Miranda (*Equus asinus*) no seu solar de criação em Portugal, varia entre a ajuda nos trabalhos agrícolas, o pastoreio livre em lameiros e o confinamento noturno. A pastagem representa, geralmente, a base da alimentação destes animais, podendo haver uma influência da dieta na capacidade de resistência destes animais face aos parasitas gastrointestinais. Este trabalho teve como objetivos principais estudar o comportamento alimentar em liberdade, estimar a composição da dieta e avaliar em simultâneo a carga parasitária de um grupo de burros de Miranda em regime de pastoreio livre. Para o efeito, um grupo de 8 burros de burros de Miranda foram utilizados. O trabalho consistiu em dois períodos de estudo (junho e julho), nos quais os animais estiveram, durante o período de luz, num lameiro de 1,6ha. Cada período de estudo teve a duração de 4 dias nos quais foi avaliado o comportamento alimentar, com colheita de fezes duas vezes ao dia (manhã e final da tarde) e de amostras da pastagem. Nos primeiros dois dias de cada período recolheram-se dados sistemáticos de observação de 15 em 15 min desde o amanhecer ao anoitecer para a estimativa do tempo em pastoreio. A estimativa da dieta realizou-se através da metodologia dos n-alcanos (fezes e amostras da pastagem) durante 4 dias consecutivos. Para a análise parasitológica, utilizou-se o método de McMaster (contagem dos Ovos por Grama, OPG) e coproculturas (para identificação de L3) em todas as amostras. No que respeita aos resultados do comportamento alimentar, não houve diferenças quanto aos padrões de comportamento alimentar, verificou-se que os animais passaram 75,64% do tempo em atividades de pastoreio e cerca de 24,36% do tempo em outras atividades. Quanto à composição da dieta, verificou-se uma diferença entre os períodos de estudo, sendo que em junho a dieta teve uma proporção herbáceas/arbustivas de 66/34, enquanto em julho esta passou para 98/2. Em termos de composição química, os resultados da pastagem estão de acordo com o avançar do ciclo vegetativo das plantas. Na avaliação parasitológica os animais apresentaram, 12% de amostras positivas à contagem de ovos por grama de fezes (valores médio de OPG ao longo do estudo: 0; 6,25; 87,5) e 33% de amostras positivas à coprocultura, com o predomínio de *Cyathostomum sensu latum* morfotipo A (83,33%).

O estudo sugere que o Burro de Miranda é uma espécie seletiva, apresentando necessidades de fibra consideráveis na alimentação. Houve uma diminuição do consumo de arbustivas ao longo do estudo e um aumento progressivo de OPG. Sugere-se a problemática do controlo da ciatostomíase, dada a sua prevalência e abundância, que aumentaram durante o período de estudo. Este trabalho apresenta os primeiros dados sobre o comportamento alimentar e estimativa das dietas em burros de Miranda, e revela informações interessantes que poderão ser usadas em práticas de manejo deste equídeo.

Palavras-chave: Burro de Miranda, Lameiro, Ciatostomíneos, Dieta, Comportamento, n-alcanos

STUDY OF FEEDING BEHAVIOR AND EVALUATION OF GASTROINTESTINAL PARASITISM IN MIRANDA DONKEY (*Equus asinus*) IN FREE GRAZING SYSTEM

Abstract

The role of the Miranda donkey (*Equus asinus*) in Portugal varies between day work in agriculture lands, grazing in *Lameiros* and night confinement. Pasture is, generally, the main feed of the donkey and there might be an influence of diet in these animals resistance to gastrointestinal parasites.

The objective of this study was to understand the feeding behaviour, estimate diet composition and evaluate simultaneously the parasite load in a group of donkeys under free range conditions. For this purpose, 8 animals were used. The study occurred in two different periods: June and July. In the study periods, animals were kept during the day hours in a 1,6ha pasture. Feeding behaviour was evaluated by observing the animals every 15 min. on two consecutive days from sunrise to sunset. Diet composition estimation was made using the n-alkane technique. Pasture samples were collected for pasture characterization and faecal samples were collected daily during 4 consecutive days. For parasitological analysis McMaster technique (Eggs per Gram counts, EPG) and fecal cultures for L3 identification were used in all samples.

Results showed no differences concerning feeding behaviour patterns between the two periods; animals spent 75.6% of the time in pasture activities, and 24.4% in other activities. Concerning diet composition, there was a shift in the herbaceous/shrub proportion from June (66/34) to July (98/2). With regard to chemical composition of pasture, the results are consistent with the growing season of plants. Concerning parasitological tests, parasite level showed 12% positive samples for EPG (mean values of EPG during the study: 0, 6.25, 87.5) and 33% positive to cyathostomins in the fecal culture, with the dominance of *Cyathostomum sensu latum* morphotype A (83.33%).

The study suggests that this species is selective, presenting a considerable need for fiber in the diet. There was a decrease in consumption of shrub through the study period and a progressive increase in EPG. It is suggested the issue of cyathostomiasis control according to their prevalence and abundance, which risen through the period of study. This work presents the first data concerning feeding behaviour and diets estimation in Miranda donkeys, and reveals interesting information that can be used in management practices.

Keywords: Miranda Donkey, *Lameiros*, cyathostomins, diet, behaviour, n-alkanes

ÍNDICE GERAL

Resumo de Atividades	1
1. Laboratório de Parasitologia da FMV-UL	1
2. Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino (AEPGA)	1
PARTE 1 – Revisão Bibliográfica.....	6
I. Introdução	7
1. Burro de Miranda	7
2. Lameiros, prados de Portugal	8
II. Comportamento alimentar asinino em pastoreio	10
1. Atividades diárias	10
2. Fatores que afetam o comportamento alimentar asinino	12
2.1. Hierarquia de dominância e competição por recursos	12
2.2. Alimentação e Preferências alimentares	12
2.3. Importância da pastagem	13
3. Estimativa da dieta em animais em pastoreio	14
3.1. Valor Nutricional das pastagens	14
3.2. Métodos de estimativa da dieta em animais em pastoreio	15
3.2.1. Observação direta	15
3.2.2. Análise Micro-histológica de fragmentos vegetais	16
3.2.3. N-alcanos	16
III. Parasitas Gastrointestinais (GI) do Burro em pastoreio	18
1. Importância	18
2. Classe Nematoda	21
2.1. Trichostrongylidae	21
2.2. Strongylidae	22
2.2.1. <i>Strongylus vulgaris</i>	22
2.2.2. <i>S. edentatus</i>	22
2.2.3. <i>S. equinus</i>	23
2.2.4. <i>Oesophagodontus</i> spp.	23
2.2.5. <i>Triodontophorus</i> spp.	23
2.2.6. Cyathostominae	23
2.3. Oxyuridae	24
2.4. Habronematidae	24
2.5. Ascarididae	25
2.6. Strongyloididae	25
3. Classe Coccidea	26
3.1. Eimeriidae	26
4. Classe Cestoda e Trematoda	26
PARTE 2 – Trabalho Experimental.....	29
IV. Objectivos	30
V. Material e Métodos	30
1. Caracterização da área de estudo	30
1.1. Localização da área de estudo (Anexo 1)	30
1.2. Descrição da área de estudo	30
2. Caracterização climática	31
3. Animais, Maneio e Delineamento Experimental	32
3.1. Animais	32
3.2. Maneio	33
3.3. Delineamento Experimental	34
4. Análise do comportamento em pastoreio e seleção da dieta	35
5. Amostragem da pastagem	35
6. Amostragem e colheita de fezes	35
7. Análises químicas	36
7.1. Preparação das amostras para análise laboratorial	36

7.2. Análises químicas	36
7.3. Análise de fenólicos totais e taninos.....	36
7.4. Doseamento dos n-alcanos.....	36
8. Técnicas parasitológicas para detecção de Parasitas GI.....	37
8.1. Método de McMaster.....	37
8.2. Método de Coprocultura	37
9. Análise de dados	38
VI. Resultados.....	39
1. Avaliação da vegetação	39
2. Avaliação da composição química dos alimentos.....	39
3. Comportamento em pastoreio	40
4. Composição da dieta.....	44
5. Condição corporal	48
6. Avaliação dos parasitas GI - Estudo de prevalência	49
7. Avaliação da biodiversidade parasitária.....	51
8. Análise da variação do grau de parasitismo por strongilídeos através do OPG e LPG em cultura	52
VII. Discussão	55
1. Análise da vegetação	55
2. Análise da composição química da dieta.....	55
3. Análise do comportamento em pastoreio.....	56
4. Análise da composição da dieta	58
5. Condição corporal	61
6. Parasitas GI.....	62
7. Considerações globais	67
VIII. Conclusão.....	71
IX. Trabalhos futuros.....	72
X. Bibliografia	73
Anexo 1 – Localização da área de estudo	84
Anexo 2 – Lista da vegetação natural identificada no lameiro em estudo, segundo a taxonomia e nome comum	85
Anexo 3 – Folha de campo destinada à anotação de dados relativo ao comportamento alimentar	88
Anexo 4 – Metodoloia das análises químicas dos alimentos e fezes	89
Anexo 5 – Metodologia das técnicas coprológicas.....	93
Anexo 6 – Chave dicotômica de identificação de alguns nematodes.....	94
Anexo 7 – Distribuição da totalidade do tempo gasto pelos animais (%), segundo as zonas do lameiro no fim do estudo.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da localização dos distintos parasitas que podem afectar a espécie asinina (Fotografia original).	2
Figura 2. Burro de Miranda em pastoreio num lameiro de Atenor (Fotografia cedida por Cláudia Costa).....	8
Figura 3. Cronograma do trabalho realizado.	34
Figura 4 e 5. Ciatostomíneo do tipo A (à esquerda, ampliação aproximadamente 100x) e Ciatostomíneo do tipo C (à direita, ampliação aproximadamente 250x), exemplares encontrados nas coproculturas realizadas (Fotografia original).	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa das principais actividades diárias (min.) dos asininos (machos castrados, alfeiras, aleitantes e burranco) com base num estudo no Gana (adaptação de Conacoo & Avorynyo, 1998).	10
Tabela 2. Taxonomia referente a diversidade de helmintes encontrados em asininos, segundo a bibliografia existente em Portugal (adaptação de Soulsby, 1986).	21
Tabela 3. Tabela esquemática sobre a diversidade de parasitismo relevante em asininos, destacando características do ciclo biológico, método de diagnóstico e referência de observação bibliográfica.	27
Tabela 4. Tabela esquemática sobre a diversidade de parasitismo relevante em asininos, destacando características do ciclo biológico, método de diagnóstico e referência de observação bibliográfica (continuação).....	28
Tabela 5. Descrição das zonas divididas no lameiro segundo a área (ha) e sua proporção (%).	31
Tabela 6. Descrição do grupo de animais em estudo, segundo o nome, número de <i>microchip</i> , ano de nascimento e identificação.....	33
Tabela 7. Descrição da altura média do pasto (cm) e da biomassa disponível (ton MS/ha) do lameiro segundo as zonas, antes do início de cada época de estudo.....	39
Tabela 8. Composição química (g/kg MS) dos componentes vegetais identificados, Herbáceas e Arbustivas, nas duas épocas de estudo (junho e julho).	40
Tabela 9. Dinâmica de ocupação das pastagens, em min. e proporção (%), de acordo com o tempo pastoreado em cada zona ao longo de todo o estudo. Com referência à área (ha) de cada zona do lameiro e sua proporção (%).	40
Tabela 10. Concentração dos n-alcanos (mg/kg MS) dos componentes vegetais identificados, Herbáceas e Arbustivas, em cada época de estudo.	46
Tabela 11. Concentração fecal (mg/kg MS) dos n-alcanos referentes aos animais segundo a época de estudo, junho e julho.	47
Tabela 12. Comparação da dieta selecionada pelos animais em cada época em estudo, junho e julho.	48
Tabela 13. Variação da condição corporal dos animais entre cada época de estudo, junho e julho.....	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição do tempo (%) despendido pelo grupo de animais, em cada zona do lameiro nos quatros dias de observação durante as duas épocas de estudo (junho e julho).	41
Gráfico 2. Distribuição do número médio de animais que se apresentavam na actividade de pastoreio na primeira época de observações (3 e 4 de junho).....	43
Gráfico 3. Distribuição do número médio de animais que se apresentavam na actividade de pastoreio, ingerindo Herbáceas ou Arbustivas, na segunda época de observações (11 e 12 de julho).	43
Gráfico 4. Proporção do tempo despendido, relativo ao tipo de alimentação – Herbáceas ou Arbustivas, e ao tempo dispendido para outras actividades - Negativo, na segunda época de observações (julho).....	44
Gráfico 5. Análise dos componentes principais das amostras de alimentos, correspondentes à primeira época do estudo (junho).	45
Gráfico 6. Análise dos componentes principais das amostras correspondentes à segunda época do estudo (julho).	45
Gráfico 7. Taxa de prevalência de OPG.....	49
Gráfico 8. Taxa de infecção observada ao longo do estudo.....	50
Gráfico 9. Evolução da variação da carga parasitária (OPG) de cada animal presente no estudo, desde Novembro de 2012 a Setembro de 2013 (Dados complementares à data do estudo cedidos pelo Dr. Sérgio Sousa).....	50
Gráfico 10. Frequência relativa das amostras positivas à coprocultura.	51
Gráfico 11. Abundância proporcional média (%) dos diferentes morfotipos de <i>Cyathostomum sensu latum</i> observados.....	51
Gráfico 12. Relação de OPG,LPG na primeira recolha de amostras (2.6.13) - Início do estudo.	53
Gráfico 13. Relação OPG, LPG na segunda recolha de amostras (2.7.13) - Meio do Estudo.	53
Gráfico 14. Relação OPG, LPG na terceira e última recolha de amostras (22.7.13) - Fim do estudo.	53
Gráfico 15. Rendimento calculado a partir dos resultados de OPG e LPG.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÓNIMOS E SIMBOLOS

AEPGA – Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino

A.C. – Antes de Cristo

ADF – *Acid Detergent Fibre* (Fibra Detergente Ácida)

ADL – *Acid Detergent Lignin* (Lenhina Detergente Ácida)

He: hélio

aprox. – aproximadamente

CC – Condição Corporal

cm – centímetros

CT – *Condensed Tannins* (Taninos Condensados)

FID – detetor de ionização de chama

GI – Gastrointestinal

g/kg – grama por kilograma

h – horas

ha – hectare

IFAP – Instituto de Financiamento de Agricultura e Pescas

IPMA – Instituto Português do Mar e Atmosfera

L1- primeiro estágio larvar

L2- segundo estágio larvar

L3- terceiro estágio larvar

L4- quarto estágio larvar

L5- quinto estágio larvar

LPG – Larvas Por Grama de fezes

mm – milímetros

Min. – minutos

ml – mililitros

MO – Matéria orgânica

MS – Matéria Seca

NDF – *Neutral Detergent Fibre* (Fibra Detergente Neutra)

OPG – Ovos Por Grama de fezes

PPP – Período Pré-Patente

p – probabilidade

PB – Proteína Bruta

SD – *Standard-deviation* (desvio-padrão)

Ton – toneladas

μL – microlitros

Z1 – Zona 1

Z2 – Zona 2

Z3 – Zona 3

Z4 – Zona 4

Z5 – Zona 5

Z6 – Zona 6

Resumo de Atividades

O nosso estágio curricular englobou duas vertentes. Uma primeira fase no Laboratório de Parasitologia da FMV-UL e uma segunda parte com foco ao trabalho prático na Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA).

1. Laboratório de Parasitologia da FMV-UL

A passagem pelo Laboratório de Parasitologia, foi bastante gratificante no sentido que conseguimos orientar o rumo do estágio curricular e a “simpatia” pelos parasitas ajudaram na busca de aprofundar diversos conhecimentos. Inicialmente estivemos durante um mês no Laboratório de Parasitologia, onde pudemos acompanhar e aprender as diversas técnicas de diagnóstico aí utilizadas, podendo destacar, as técnicas coprológicas qualitativas e quantitativas (técnicas de sedimentação, flutuação, técnica de McMaster e McMaster modificado, e coprocultura), esfregaço fecal direto para a pesquisa do género *Cryptosporidium* sp., técnica de Baerman para a pesquisa de nemátodes pulmonares, método de Knott para diagnóstico de microfilárias (géneros *Dirofilaria* e *Acanthocheilonema*), esfregaços sanguíneos para a pesquisa de hemoparasitas (exemplos: *Babesia* sp., *Theileria* sp., *Leishmania* sp.), raspagem profunda para pesquisa de ácaros e visualização em lupa das estruturas de diversos parasitas, pertencentes à classe Insecta e Arachnida. As amostras recolhidas no laboratório provinham das diversas espécies domésticas – canídeo, felino, bovino, caprino, ovino, equídeos, galináceo e cunicolas; espécies exóticas – arara, papagaio, chinchila e pombo; e também de animais selvagens – javali, gamo e sacarrabos. Também tivemos a oportunidade de assistir e ajudar os jovens estudantes nas aulas práticas de Parasitologia-I, assim como elaborámos um poster-imagem (figura 1) para o Laboratório, de um burro com a localização específica de cada parasita, segundo o órgão que afetam no hospedeiro.

2. Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino (AEPGA)

Contextualização – uma raça asinina em Trás-os-Montes

A AEPGA, é uma associação sem fins lucrativos, com sede na aldeia de Atenor – Miranda do Douro. A AEPGA oferece serviços de apoios a todos os criadores, como a vacinação contra o Tétano e Gripe, colocação do *microchip*, colocação do animal no livro de Adultos da raça asinina de Miranda, preenchimento dos trâmites necessários para a receção dos subsídios, sendo um elo fundamental entre estes pequenos criadores (muitos analfabetos) e o mundo burocrático; oferece também serviços veterinários e promove o melhoramento genético da raça com o intuito de aumentar o número de animais reprodutores. A AEPGA

[illegible]

Em Atenor, localiza-se o Centro de Valorização do Burro de Miranda, que alberga cerca de 60 animais, dentro dos quais o efetivo reprodutor (fêmeas), crias, machos castrados e machos inteiros. É neste centro, que realizam todas as atividades de ecoturismo, promovendo também a recuperação do património cultural e socioeconómico da zona. Neste local é efetuada a reprodução (cria e cria), onde tivemos a oportunidade de colaborar com uma médica veterinária encarregue da reprodução, e colocou-se em prática um controlo do ciclo estrico das fêmeas, realizando-se a todas as burras aptas para a reprodução o controlo por ecografia transretal, palpação e exame com vaginoscópio, bem como o diagnóstico de gestação entre os 8 e 16 dias com visualização da vesícula embrionária. Aqui tivemos a oportunidade de compreender o comportamento reprodutivo asinino através da deteção de cio (apresentam um papel mais ativo e dinâmico aquando da

corte, sinais como mascar, comportamento homossexual, e outros semelhantes às éguas) e da realização das montas. No final da época reprodutiva conseguimos 17 fêmeas gestantes na época reprodutiva e diagnosticamos o caso de uma burra com hímen persistente. Registámos o nascimento de 5 burrancos e os seus cuidados neonatais com verificação dos instintos – reflexo de sucção, decúbito esternal, tentativa de mamar nas primeiras 3 horas), expulsão do mecónio (primeiras 12h de vida), expulsão da placenta nas primeiras 3 horas pós-parto e desinfeção do umbigo. A gestação dura cerca de 12 meses e a mãe forma uma ligação bastante forte com a sua cria. As burrancas (burras jovens) são consideradas aptas para reprodução aos 4-5 anos. Assistimos a um parto com rejeição da cria por parte da mãe, no entanto coincidiu com um outro parto de outra burra, a abordagem médica foi esfregar a placenta do parto da burra-mãe adotante no burranco (rejeitado) recém-nascido, de modo que quando a Mãe-adotante o cheirasse, reconhecesse como seu filho, e obteve-se um resultado positivo. Tivemos a oportunidade de assistir a um caso clínico de uma burra gestante de 10 meses, que apresentava sintomatologia de entrada em trabalho de parto (irrequieta, nervosa, relaxamento do ligamento sacrociático, zona do períneo e vulvar edematosa, e presença de colostro nas glândulas mamárias), considerando que este animal apresenta um historial de gestação dupla, optou-se por induzir o parto e verificou-se a presença de três fetos subdesenvolvidos.

Durante o Verão, os cuidados básicos abordavam o controlo das feridas de Verão, denotando uma resposta positiva ao utilizar mel (uma camada superficial) sobre a ferida, com cicatrização rápida. Tendo em conta o trabalho distinto do burro e do cavalo, as doenças comuns dos equinos não são as mesmas dos asininos. Por isso nos burros, é mais frequente a ocorrência de doenças nas extremidades dos membros, como: putrefação da sola, abcessos da sola, laminites, pinças gastas, inflamações da ranilha, entre outras. Nos asininos existe uma prevalência bastante grande de formação de abscessos, e a abordagem incide na drenagem de toda a zona afetada, com colocação de pensos e terapia antibiótica e analgésica. É relevante recordar que o burro é um animal estóico, e a abordagem da dor tem em conta principalmente a frequência cardíaca, e também a prostração do animal, que não come ou não se levanta.

Tivemos também a oportunidade de assistir e participar nos seguintes eventos:

1. Workshop “Introdução à Medicina Veterinária de Asininos” (19 e 20 de Outubro de 2012);
2. Workshop de Aparo Corretivo de Cascos (16 e 17 de Fevereiro de 2013), sob a formação dos coordenadores: Dr. Miguel Quaresma e do ferrador Manuel Campeão;
3. IV Workshop de Castração de Equídeos, 2 e 3 de Março de 2013, sob a formação dos coordenadores: Dr. Miguel Quaresma e Dr. Jesus Buil;
4. Formação Básica na Manutenção e Cuidado de Asininos, 9 e 10 de Março de 2013;
5. III Curso “Maneio e Tração Animal”, aldeia de Paradela, Miranda do Douro (13 e 14 de Abril de 2013).

Aprendemos ainda que o trabalho do campo é árduo. Os burros são animais de rotinas, e a alimentação faz parte da sua rotina. A alimentação deste centro é efetuada à base de feno pela manhã e palha de aveia principalmente, pela tarde.

Centro de Acolhimento do Burro – Polo de Duas Igrejas

Atualmente neste centro localizam-se cerca de 10 muares. Aqui tivemos a oportunidade de aprender a reconhecer alguns dos problemas dentários (exemplo: sobrecrecimentos, lâminas laterais e mediais, desalinhamentos, gengivites, doença periodontal, abscessos, diastemas, braqui e prognatismos), e tipos de manutenção/tratamento a realizar.

Centro de Acolhimento do Burro - Pena Branca

A AEPGA, também está envolvida num projeto contra o abandono dos burros (de Miranda ou sem raça definida), principalmente os de idade mais avançada e de donos com impossibilidade de continuar a criação. A AEPGA realiza os regates dos burros por todo o país, e todos estes à chegada são colocados em quarentena, onde o animal é avaliado a nível de um exame físico completo e minucioso, desparasitação, colocação de *microchip* e vacinação contra o tétano e gripe caso não tenha sido efetuada. Estes animais se respondem positivamente a toda a abordagem e mostram uma boa adaptação (à mudança de habitat, alimentação e convivência com outros burros) passam para o Centro de Acolhimento de Pena Branca. Este centro envolve cerca de 40 animais (machos castrados e fêmeas não reprodutoras) e usufrui de um importante apoio do Donkey Sanctuary, uma associação inglesa, que visa a proteção e estudo dos asininos, promovendo-os e apoiando financeiramente diversos centros de acolhimento por todo o mundo, principalmente em países considerados subdesenvolvidos. Este centro implica um acompanhamento veterinário constante, visto que todos os burros aí presentes são geriátricos, necessitando diariamente de apoios e onde cada dia surge algum imprevisto. Diariamente alimenta-se cada animal segundo as suas necessidades específicas e doenças envolventes, administram-se diversas medicações, procede-se a mudas de pensos (curvilhão, boleto e casco, principalmente), manutenção dentária e cascos, assim como outros diagnósticos específicos (exemplo: úlcera ocular através da tira de fluoresceína, com tratamento tópico com um anti-inflamatório não esteroide e antibiótico). A problemática da hiperlipemia em burros, não tendo grande relevo no centro da AEPGA, a situação reverte-se, tanto em Pena Branca como nas aldeias com o aumento da incidência, devido sobretudo à idade da população asinina aí existente. É uma doença frequente em burros e póneis, e estes quando param de comer, existe mobilização da energia armazenada para o fígado, com o intuito de converter os ácidos gordos livres em triglicéridos, no entanto o mecanismo hormonal (insulina) para parar este sistema não é eficaz, resultando num aumento de gordura circulante, podendo ser medido no sangue. As fêmeas (gestantes e aleitantes) são mais predispostas que os machos, animais com sobrepeso, *stress* (associado a mau tempo, transporte, perda de um amigo ou novos amigos) e qualquer outra doença subjacente. O

tratamento tem por base restituição dos fluidos, suporte nutricional (o animal tem de comer!), terapia sintomática (anti-inflamatórios, antibiótico, multivitaminas) e tratamento de doenças concomitantes.

Saídas de Campo

O estágio englobou grande parte do tempo no Centro de Valorização do Burro de Miranda, no entanto houve diversas vezes em que tivemos a oportunidade de acompanhar o veterinário em algumas consultas ao domicílio. Destacamos a incidência de cólicas com o início da primavera (os animais vão para a pastagem de madrugada, quando os rebentos estão gelados e com níveis altos de carboidratos), as laminites (consequência essencialmente de uma alimentação demasiado rica em carboidratos e proteínas, animais de idade avançada) e outras claudicações, problemas neonatais e mamites.

Outras Atividades

Salientamos que, no âmbito do estudo efetuado, tivemos duas semanas no laboratório de Nutrição Animal da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, onde tivemos a oportunidade de aprender e colocar em prática várias técnicas laboratoriais para a determinação da composição química dos alimentos e extração de alcanos.

Durante estes 6 meses tivemos a oportunidade de participar numa panóplia de atividades, umas mais divergentes que outras em relação a atividade médico-veterinário (exemplo: ajuda na horta; anilhagem de pombos e respetiva colocação em pombais, e manutenção e controlo do bem-estar, alimento e água em alguns pombais com a associação Palombar; montagem de sistema de água). No entanto, hoje, destacamos a sua importância, pois realmente tivemos a oportunidade de viver e conviver com o verdadeiro mundo rural de Portugal, onde verdadeiramente o papel do médico veterinário é fundamental para o seu sustento. Como associação, a AEPGA, é gerida por um grupo de pessoas de diversas idades, áreas e experiências diferentes, e para o seu equilíbrio e organização é necessário colocar algumas regras e hábitos associativos, como realizações de assembleias para a organização e gestão dos objetivos. A AEPGA com o objetivo de revitalização do mundo rural, promove e participa em diversos eventos, como “Por Tierras D L Rei” (23 e 24 de Março), “A ronda das Adegas” (7 a 9 de junho) em Atenor, Festival Itinerante da cultura tradicional “L burro I L Gaiteiro” (24 a 28 de julho), onde tivemos a oportunidade de ajudar na organização. São de facto atividades necessárias nestas terras, reavivando e revalorizando velhas tradições que hoje em dia são praticamente esquecidas. Visando este panorama, Trás-os-Montes insere-se como uma zona do país cheia de riqueza e potencial, sendo importante a continuidade do trabalho que a AEPGA e outras associações (Palombar e Associação ALDEIA) têm aí realizado com os seus habitantes e respectivos animais, assim como com os visitantes.

PARTE 1 – Revisão Bibliográfica

I. Introdução

1. Burro de Miranda

O burro ou asno (*Equus asinus*) doméstico é um mamífero solípede com origem em África, e apesar de existirem diversas teorias no que respeita à sua ascendência, sabe-se que houve a expansão de um tronco europeu e a sua domesticação remete-nos à cerca de 5000 anos A.C. (French, 1999). Acredita-se que a partir desta subespécie do tronco europeu, *Equus asinus europeus*, surgiram diferentes raças que se foram adaptando consoante as condições orográficas, climáticas, ecológicas e selecionadas de acordo com as necessidades dos criadores de cada região (Quaresma, Nóvoa, Monteiro, Almeida & Portas, 2005). Em Portugal, há referências de vestígios arqueológicos da presença de asininos desde o Paleolítico (D'Andrade, 1939). Em 2001, foi reconhecida a primeira raça – Burro de Miranda, que até à data é a única existente em Portugal e paralelamente foi criada a AEPGA com o principal objetivo de proteção e promoção do Gado Asinino (Afonso, Candeias & Pratas, 2013). Segundo a AEPGA, em 2012-2013 estima-se uma população asinina com cerca de 10 000 animais (Miguel Nóvoa, comunicação pessoal, Outubro 20, 2013), onde se encontram registados como efetivo reprodutor da raça de Miranda: 780 fêmeas e 48 machos (Afonso *et al*, 2013). A criação e o desenvolvimento de sistemas de produção animal em áreas menos favorecidas podem fornecer um benefício ambiental e económico, contribuindo para a melhoria das condições de vida das populações rurais (Ferreira *et al*, 2013; García *et al*, 2013). Atualmente a raça, apesar dos progressos resultantes do grande trabalho realizado, apresenta o estatuto de muito ameaçado (Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas – IFAP, 2014). Podendo ser isto um reflexo da diminuição da agricultura e pecuária de subsistência, o abandono da terra, levando a degradação da paisagem tradicional que é substituída pela vegetação (Barbosa, 2003; Plieninger, Höchtla & Spekb, 2006), devido a políticas desajustadas à realidade do nosso país.

O burro de Miranda, no seu contexto geográfico e sociocultural caracteriza uma zona remota de Portugal que ainda mantém vivas as suas tradições, saberes e língua. O solar desta raça asinina é a região norte do concelho de Miranda do Douro. No entanto o seu núcleo abrange tanto o concelho de Miranda do Douro, como os de Bragança, Vimioso e Mogadouro. As características que levaram à sua domesticação são sobretudo a força, resistência física, rusticidade e docilidade, permitindo o desenvolvimento de sistemas de transporte e da agricultura através da tração animal, bem como serviram para a alimentação humana e produção mulateira (Blondel & Aronson, 1999; Quaresma *et al*, 2005).

Figura 2. Burro de Miranda em pastoreio num lameiro de Atenor (Fotografia cedida por Cláudia Costa).



A adaptação às condições edafo-climáticas extremas que caracteriza a região e à grande capacidade de valorizar forragens de baixo valor nutritivo, permitiu a sua manutenção face à sua valorização económica praticamente nula (Marques, 2006).

O burro hoje em dia na Europa, ganha valor como produtor de leite para as indústrias farmacêutica e cosmética, em ecoturismo, em terapias com asininos para pessoas com necessidades especiais, e é usado cada vez mais como um animal de companhia (ou *pet*) (Barbosa, 2003; Quaresma *et al*, 2005; AEPGA, 2012).

2. Lameiros, prados de Portugal

Os lameiros são prados perenes seminaturais, localizados nas regiões montanhosas, característicos de zonas de maior altitude, do centro e norte do país, com uma composição florística diversificada por espécies espontâneas, mas com predominância de gramíneas (Vieira, Fernandes, Bernardo, Martins & Moreira, 2000). Desenvolveram-se integrados num sistema produtivo que pretendia a autossuficiência, com investimentos praticamente nulos, e eram a base da alimentação do efetivo pecuário, sobretudo bovinos. Neste sistema de pastagem também havia a interligação a outros tipos de sistemas agrários, como culturas de centeio, hortas e inclusive zonas florestais (Poças, Cunha & Pereira, 2006). Os lameiros localizam-se preferencialmente junto a linhas de água ou zonas edáficas naturalmente húmidas, usufruindo de regadio total ou parcial (Pires, Pinto & Moreira, 1994). Sendo assim, os lameiros podem classificar-se segundo a disponibilidade de água: Lameiro de regadio, com disponibilidade de água o ano inteiro e neste contexto surge a origem da palavra

lameiro (Lama) estando associado a pastagens com muita água e solos de textura a tender para o argiloso (Pires *et al*, 1994); Lameiro de regadio imperfeito, não apresenta disponibilidade de água durante o ano inteiro; e Lameiro de sequeiro, que não tem água de rega disponível ao longo do ano (Vieira *et al*, 2000). Podem também classificar-se quanto ao tipo de aproveitamento a que estão sujeitos, sendo: Lameiro de pasto ou *Pastigueiro*, aproveitado exclusivamente para pastoreio; Lameiro de Erva ou *Segadeiros* utilizado exclusivamente para corte sendo a erva consumida de imediato pelos animais; e Lameiro de Feno, são os mais representativos e os que mais contribuem para a alimentação do gado, sendo utilizados parcialmente para pastoreio em parte do ano e depois reservados para que possa existir um último corte da erva para feno no início do Verão, feno este que será utilizado na alimentação do inverno (Moreira, Aguiar & Pires, 2001; Pereira & Sousa, 2005). A estas pastagens de montanha, é de destacar o seu valor ambiental e paisagístico pela descontinuidade oferecida pelos muros arbóreos que dividem as terras. Desta combinação resulta um mosaico que pelas suas características, contribui para a variabilidade ecológica, tanto a nível florístico como faunístico. O manejo agrossilvopastoril a que estão sujeitos, permite também a valorização de raças autóctones, como a raça bovina Mirandesa e a raça ovina Churra Galega Mirandesa (Pereira & Sousa, 2005). A descontinuidade desta paisagem também dificulta a propagação de grandes incêndios florestais, reduz o risco de erosão por apresentarem uma cobertura permanente do solo, assim como promove a infiltração da água evitando inundações e aumentando os mananciais subterrâneos (Pires *et al*, 1994; Moreira *et al*, 2001).

II. Comportamento alimentar asinino em pastoreio

Estima-se que, em estado selvagem, o burro atinja uma idade média de vida de 15-20 anos, e em cativeiro pode chegar aos 40 anos (French, 1999). Em estado selvagem, desenvolveu padrões comportamentais e de organização social bastante flexíveis permitindo a sua sobrevivência em diversas regiões por todo o mundo (French, 1999).

1. Atividades diárias

A rotina do burro está dependente das suas necessidades imediatas, alimentação, consumo de água (hidratação) e abrigo (French, 1999). O tempo dedicado à alimentação depende do tipo de trabalho realizado pelo animal e das condições climáticas, no entanto, animais em estado selvagem podem chegar a dedicar cerca de 85% (Tabela 1) do tempo para a actividade de pastoreio, tempo este maioritariamente diurno (Aganga & Tsopito, 1998). O tempo que dedicam ao pastoreio é definido por momentos a pastar (cerca de 30-45 minutos) e momentos de descanso (5-10 minutos), onde levantam a cabeça para olhar para o espaço envolvente e mudam de local (Aganga & Tsopito, 1998).

Tabela 1. Estimativa das principais actividades diárias (min.) dos asininos (machos castrados, alfeiras, aleitantes e burranco) com base num estudo no Gana (adaptação de Conacoo & Avorynyo, 1998).

Burros Actividade	Macho Castrado	Alfeira	Fêmea Aleitante	Burranco
Pastoreio	367.3±25.5 (82.5)	357.0±3.6 (85.0)	290.4±34.6 (83.8)	216.5±36.5 (62.4)
Explorar, vaguear	64.6±12.4 (14.5)	48.3±4.0 (11.5)	45.7±7.0 (13.2)	72.7±6.7 (21.0)
Espojar	1.3±0.6 (0.3)	1.3±1.5 (0.3)	2.0±1.0 (0.6)	0.7±1.5 (0.2)
Descanso	5.3±6.8 (1.2)	3.0±4.4 (0.7)	0	43.0±15.7 (12.4)
Aleitamento	-	-	4.7±0.6 (1.3)	4.7±0.6 (1.3)
Grooming	0.3±0.1 (0.1)	1.6±0.2 (0.4)	0.9±0.3 (0.3)	6.0±5.2 (1.7)
Hidratação	1.0±0.9 (0.2)	0.8±0.1 (0.2)	0.5±0.4 (0.2)	0
Urinar	0.18±0.32 (0.04)	0.18±0.00 (0.04)	0.12±0.21(0.03)	0.30±0.28 (0.09)
Defecar	0.2±0.4 (0.1)	0.7±0.2 (0.2)	0.4±0.3 (0.1)	0.2±0.2 (0.1)
Zurrar	0.3±0.6 (0.1)	0.4±0.3 (0.1)	0.1±0.1 (0.01)	0.3±0.2 (0.1)
Outras actividades	4.3±5.1 (1.0)	1.9±0.5 (0.5)	6.6±2.4 (1.6)	2.3±1.7 (0.7)
Tempo total de observação	445.0	420.0	346.7	346.7

São animais seletivos, e passam parte do tempo reservado para a actividade de pastoreio à procura das partes de plantas que preferem (Smith & Wood, 2008). Estes animais estão anatómica e fisiologicamente adaptados à alimentação em pastoreio o que se reveste de elevada importância na zona de Trás-os-Montes para a preservação dos lameiros, que se degradam pelo contínuo aumento do seu desuso (AEPGA, 2012).

Os burros bebem água com pouca frequência e de forma irregular, no entanto verifica-se que os membros de um mesmo grupo têm tendência para beber todos juntos (French, 1999). Pearson, Archibald e Muirhead (2001), no seu estudo com pôneis e burros, constataram que os burros bebem menos água por matéria seca (MS) ingerida comparativamente com os pôneis, revelando uma aparente maior capacidade para lidar com a desidratação. Esta maior tolerância à desidratação é essencial para a sua sobrevivência e adaptação em desertos quentes onde podem pastar durante 24h até regressar a uma fonte de água (Dill, Yousef, Cox & Barton, 1980; Nengomasha *et al*, 1999 citado por Smith & Pearson, 2005). O descanso é intercalado com os períodos de ingestão de alimento e geralmente é observado nas horas de maior calor (French, 1999). Em termos evolutivos, o burro é uma presa na cadeia alimentar e como tal, a sua organização social em grupos permite alternarem as horas de descanso, devido à existência de animais, dentro da manada, encarregues da vigilância do grupo (French, 1999).

O ato de *espojar* ou *espolinhar* é também uma atividade social, onde vários animais se reúnem num terreno já definido pela manada como zona própria de espojar, e rebolam todos uns depois dos outros (French, 1999). A zona de espojar tem impacto ambiental, pois ocupa cerca de 1-2m² e, devido ao seu uso continuado, não permite o crescimento de nenhum tipo de planta (Süss & Schwabe, 2007).

O burro é um animal bastante sociável e curioso, e possui características comportamentais que os definem como “exploradores”, isto é, apresentam a capacidade de se deslocarem pelas áreas de pastoreio em busca de alimento, escolhendo o que mais lhes convém. Os adultos realizam o trote em situações de ameaças ou de alarme, quando perseguem uma fêmea, quando brincam ou quando chegam a fontes de água (AEPGA, 2012).

A frequência de defecar é variável, mas costuma ser posterior a um período de descanso e/ou em resposta à defecação de outros burros. Normalmente escolhem zonas afastadas das zonas de descanso (French, 1999). Estas zonas de latrina, onde defecam e urinam, são zonas onde os animais evitam pastar, estratégia de defesa dos animais contra os possíveis parasitas (Urquhart, Amour, Duncan, Dunn & Jennings, 1996; Süss & Schwabe, 2007). Análises a estes locais com fezes de burros têm mostrado uma grande quantidade de azoto presente, sendo comparada à adubação intensa. A decomposição do teor de azoto das fezes é bastante lenta, existindo por isso um menor impacto por perdas de azoto pela lixiviação. Também não se encontra diretamente disponível para absorção pelas plantas, podendo mais tarde ser utilizado como fertilizante para estas (Süss & Schwabe, 2007).

2. Fatores que afetam o comportamento alimentar asinino

O consumo diário de alimento, resulta do produto de três variáveis: ingestão por preensão, tempo diário de ingestão e taxa de consumo (Galli, Cangiano & Fernández, 1996).

2.1. Hierarquia de dominância e competição por recursos

Os animais herbívoros estruturalmente apresentam uma organização hierárquica, com animais dominantes e subordinados. A organização de um grupo pode promover a redução da agressividade e aumentar a tolerância entre os indivíduos, e por isso pode permitir uma maior facilidade para a resolução de conflitos. A aceitação de cada relação existente promove a coesão do grupo e melhora a tolerância entre os animais. Deste modo a comunicação e a interação social são fundamentais para a união do grupo (Dumont, Meuret, Boissy, Petit, 2001). Dentro de um grupo, as relações sociais interferem com o comportamento alimentar dos indivíduos. A distribuição espacial dos herbívoros no pasto depende da distribuição hierárquica, das relações de dominância e da disponibilidade alimentar, mas é mais fortemente influenciada pela coesão intrínseca do grupo (Dumont *et al*, 2001). A um grupo de burros dá-se o termo de *burrada* (AEPGA, 2012). Apesar de serem animais herbívoros, com uma hierarquia estabelecida, a sua organização social é relativamente flexível, o que permite que nenhum membro do grupo seja dominante a título permanente (AEPGA, 2012). A este propósito convém referir que a dominância da hierarquia asinina é complexa, pois não depende apenas de fatores como a idade, sexo, nível de agressividade ou peso, depende bastante da área de domínio de cada animal (French, 1999).

Múltiplos níveis de conflitos podem surgir numa *burrada* durante a competição pelos recursos alimentares. Este panorama ocorre principalmente, quando os recursos são limitados e normalmente favorece os animais de estatuto dominante (Aganda & Tsopito, 1998; Dumont *et al*, 2001). O sexo também tem influência neste tipo de comportamento, sendo mais observado em machos do que em fêmeas, e as fêmeas tornam-se mais dominantes quando estão gestantes para terem acesso aos melhores alimentos (Aganda & Tsopito, 1998). Os burros apresentam um instinto bastante competitivo quando são alimentados em grupo e em cativeiro (Aganda & Tsopito, 1998).

2.2. Alimentação e Preferências alimentares

Verifica-se que os burros, quando alimentados à mangedoura, preferem comer alimentos que estão habituados rotineiramente e que já conhecem. No entanto, quando em pastoreio poderão aumentar a escolha de entre os variados recursos alimentares disponíveis seja por mecanismos de aprendizagem social e/ou por tentativa (Dumont *et al*, 2001). Através do registo por observação direta, foi observado em alguns estudos o comportamento alimentar

dos burros que revelou, em parte, assemelhar-se ao dos ruminantes (mesmas espécies de plantas eleitas) (Rutagwenda, Lechner-Doll, Schwartz, Schultka & von Engelhardt, 1990). Verificou-se que os burros apresentam preferências para herbáceas (gramíneas), cardos, arbustos, plantas lenhosas, frutos, florescências, cascas das árvores estando este último associado à escassez do alimento e mesmo plantas do tipo feto, musgo e líquenes (Woodward & Ohmart, 1976; Aganga & Tsopito, 1998; Cosyns, Degezelle, Demeulenaere, Hoffmann, 2001). O burro em pastoreio apresenta uma capacidade aparentemente desenvolvida para diferenciar o que é comestível do que não é (French, 1999).

Os lábios e língua estão bem adaptados para a apreensão e ingestão de alimento e os dentes para a quebra de alimentos de modo a facilitar a digestão (Aganga & Tsopito, 1998). A forma do focinho do burro, mais estreita em relação ao do cavalo, e a flexibilidade dos lábios, principalmente do lábio superior, que é capaz de enrolar em redor de uma planta espinhosa, permite uma maior seletividade dos alimentos (Muller, Protos, Houpt & Van Soest, 1998; Pearson *et al*, 2001; Lamoot, Callebaut, Demeulenaere, Vandenberghe & Hoffmann, 2005).

O ato de mastigação envolve a diminuição do tamanho das partículas ingeridas, promove a secreção salivar e o humedecimento do alimento (Muller *et al*, 1998). Os burros, como herbívoros não ruminantes, têm somente uma oportunidade para mastigar e por isso esta deve ser mais eficiente (Conacoo & Avorinyo, 1998). O facto de apresentarem uma mandíbula forte com uma superfície molar superior em relação a outros equídeos, pode contribuir para a maior eficácia de mastigação (Muller *et al*, 1998). A duração do tempo que um animal passa a mastigar depende de vários fatores (incluindo a espécie animal), tamanho do animal, estado fisiológico, taxa de ingestão, quantidade de fibra na dieta (NDF), forma física e tamanho dos alimentos (Muller *et al*, 1998). Pearson, Archibald e Muirhead (2006), referem segundo os dados obtidos, uma maior semelhança dos burros ao metabolismo dos ruminantes no que respeita aos tempos de retenção dos alimentos (mais longos), mas com menores taxas de consumo e melhor digestibilidade aparente. Informação concreta sobre a capacidade digestiva e metabólica da digestão dos burros é escassa, no entanto, os conhecimentos existentes levam a prudência nas comparações desta espécie com os equinos (Wood, Smith, Muir & Cuddeford, 2005; Wood, 2010).

2.3. Importância da pastagem

Dumont *et al* (2001), e Hurnik *et al* (1995), citado por Santos (2010), referiram que o conhecimento do comportamento dos herbívoros em pastoreio é um pré-requisito para o uso racional das pastagens. Os fatores que afetam a seletividade e o consumo estão diretamente relacionados com as características da pastagem (espécie, estado fenológico, composição química, acessibilidade, disponibilidade e distribuição), com o clima (variações das condições ambientais) e com o manejo do solo-planta-animal (Lamoot *et al*, 2005;

Ramírez, 1989 citado por Santos, 2010). A quantidade ingerida pelo animal além de depender dos estímulos externos, depende de estímulos internos, como a fome, a interação dos nutrientes e toxinas (anti nutrientes) no organismo, provocando um conjunto de estímulos positivos ou negativos. O indivíduo é o melhor conhecedor das suas necessidades (Provenza *et al*, 2007) ou seja, as diferenças individuais da ingestão de alimentos e as preferências dependem em parte das variações da morfologia e da fisiologia do animal (mesmo em casos de grupos coesos) (Provenza, Villalba, Dziba, Atwood & Banner, 2003). Sem a presença de variedade alimentar os animais não manifestam as suas preferências e a escolha permite a individualidade (Manteca, Villalba, Atwood, Dziba & Provenza, 2008). Introduz-se assim um novo conceito emergente em produção animal baseada em sistemas de pastoreio livre, a automedicação (de origem anglo-saxónica de “self-medication”), dita que um animal é capaz de equilibrar as suas necessidades segundo a pastagem oferecida buscando o maior partido deste (Provenza *et al*, 2007).

Os animais, ao procurarem locais de alimentação, aparentemente preferem usar caminhos estabelecidos, do que penetrar em áreas arbustivas densas ou percorrer áreas de terreno acidentado. Quando os herbívoros exploram áreas heterogêneas, usam a memória para ir diretamente aos locais de alimentos favoritos, que variam com a diversidade e disponibilidade da pastagem (Dumont *et al*, 2001). Esta distribuição é fruto de aprendizagem. Assim, se a organização social do rebanho, a mobilidade, memória e preferência for tida em conta, podemos efetuar uma melhor gestão da pastagem (Dumont *et al*, 2001). A seletividade de espécies de plantas diminui com o decréscimo do valor nutricional da planta ou por aumento do encabeçamento, isto implica um consumo das espécies menos preferidas, o que altera as suas escolhas alimentares para diminuir o risco de competição dentro do grupo (Dumont *et al*, 2001; Santos, 2010).

3. Estimativa da dieta em animais em pastoreio

3.1. Valor Nutricional das pastagens

Relativamente à complexidade de uma pastagem, o seu valor nutritivo varia consoante as espécies de plantas presentes, a fertilidade do solo (características químicas e físicas), as condições climáticas e o estado de maturação da planta. No entanto, pastagens com elevado valor nutricional e com baixos teores em fibra (caso dos climas temperados) não são adequados para o burro, e aconselha-se nestes casos, um suplemento adicional de forragem com alto teor em fibra ou palha (Taylor, 1999).

Estimar o valor nutritivo médio de uma pastagem é bastante difícil, pois é um ambiente heterogêneo. Os valores obtidos por amostragem devida somente podem ser usados como referência da própria pastagem para o período em estudo. No entanto, com o intuito de ter um conhecimento mais exato do equilíbrio nutricional do animal é fundamental criar uma

relação entre as necessidades nutricionais do animal e o valor nutritivo que possui (Dove & Mayes, 1991).

3.2. Métodos de estimativa da dieta em animais em pastoreio

A necessidade de entender o comportamento alimentar é essencial para um correto manejo da mesma, e compreender a ingestão de nutrientes em função das espécies consumidas e o impacto dos animais na pastagem. A composição do alimento consumida é tão importante como a quantidade (Chen, Scott, Blair & Lefroy, 1999; Mayes & Dove, 2000; Bugalho, Mayes & Milne, 2002; Fukomoto *et al*, 2007). As escolhas do animal enquanto pasta, refletem a sua capacidade de equilibrar as suas necessidades nutricionais (Dove & Mayes, 1991). De facto, o valor nutritivo presente nas diferentes partes de planta e nas diferentes espécies de plantas pode variar consideravelmente e influenciar a ingestão dos herbívoros (Dove & Mayes, 1991; Mayes & Dove, 2000).

O estudo da medição da digestibilidade, taxa de consumo diário e estimativa da dieta é complexo e oneroso, o que muitas vezes leva à realização de estudos sob condições controladas (*in vitro*) que nem sempre podem ser extrapolados para condições de pastoreio (*in vivo*) (Oliveira & Prates, 2000). Atualmente têm sido efetuados vários estudos no âmbito da medição de estimativa do consumo da dieta em espécies pecuárias, uma vez que a ingestão de nutrientes é o principal determinante do estado nutricional e desempenho da produção destas espécies, em contrapartida estudos deste tipo são mais escassos em equinos (Gudmundsson & Thorhallsdottir, 1998; Ferreira, *et al*, 2007; Ribeiro, 2008; Ferreira *et al*, 2010) e raro em asininos (Vouzela, 2002). Num estudo “em condições de campo” é difícil estimar a composição botânica da dieta ingerida. Existem métodos diretos como identificação de fibras existentes nas fezes a partir de métodos microscópicos, e métodos indiretos como utilização de animais com fistula-esofágicas, que praticamente caíram em desuso, por dificuldade de aplicação, por preocupações crescentes a nível ético e bem-estar animal ou por falta de precisão (Dove & Mayes, 1991). Atualmente, as técnicas mais comuns são:

3.2.1. Observação direta

Esta técnica consiste na observação direta dos animais na pastagem com recolha das plantas ou partes de plantas por eles comidas, considerando que as plantas ou partes de plantas têm diferente valor nutritivo e os animais têm a oportunidade de alterar a sua dieta, o que nos permite a melhor compreensão das preferências alimentares de cada animal. Realiza-se a separação física das amostras da pastagem (das plantas seleccionadas) colhidas à mão. É uma técnica onerosa e demorada, e para uma maior precisão é necessário realizá-la quando as amostras ainda estão frescas, para uma correcta identificação. Outra das desvantagens desta técnica é a possível influência da presença do

observador que pode afetar o comportamento dos animais (Dove & Mayes, 1991).

3.2.2. Análise Micro-histológica de fragmentos vegetais

É um método indireto que tem por base a observação e identificação de fragmentos cuticulares epidérmicos dos tecidos vegetais em amostras preparadas por recolhas de animais com fistula-esofágica, conteúdos estomacal ou amostras de fezes (Dove & Mayes, 2005). Este método tem sido usado principalmente com conteúdos estomacais de animais silvestres mortos (Mayes & Dove, 2000). Por outro lado, as amostras fecais são as mais amplamente utilizadas, por permitirem a utilização de um maior número de animais. No entanto, apresenta limitações devido à digestão diferencial de diferentes fragmentos das espécies de plantas ingeridas, que podem não ser passíveis de identificação, o que reduz a fiabilidade do método. As vantagens revelam-se pela utilidade na verificação da presença ou ausência de determinada espécie de planta, e como complemento analítico com outras metodologias (Dove & Mayes, 2005).

3.2.3. N-alcanos

A comunidade científica investiga a utilização de métodos indirectos para caracterização da alimentação animal, como o recurso a marcadores, e neste ponto acresce as exigências da busca dos marcadores ideais. Existem dois tipos de marcadores, interno e externo. O marcador interno é mensurável nas fezes e tem origem na dieta, enquanto o marcador externo é administrado por via oral e em concentrações conhecidas. A escolha do tipo de marcador a usar, depende dos objetivos a avaliar (Dove & Mayes, 2006). O marcador ideal deverá ser quimicamente distinto das demais partículas existentes na digesta ou nas fezes, de modo a facilitar a sua identificação e análise, deve ser de muito baixa ou nula digestibilidade, e exibir padrões de variação inter-espécies grande e intra-espécie pequenos (Dove & Mayes, 1991; Mayes & Dove, 2006). Em 1984, Mayes e Lamb propuseram o uso de n-alcanos como marcadores da excreção fecal e da digestibilidade (Dove & Mayes, 2005). Neste sentido, o uso de n-alcanos tem-se destacado exponencialmente, permitindo um melhor conhecimento do consumo, da composição da dieta diária dos herbívoros e também revela interesse na área da botânica (quimiotaxonomia).

Hoje em dia, os n-alcanos são os marcadores mais usados em estudos de nutrição em herbívoros (Mayes & Dove, 2006), e podem ser considerados como impressões digitais das plantas, isto é, cada espécie vegetal apresenta um perfil quase único de n-alcanos (Dove & Mayes, 1991). Deste modo, o padrão individual da cera cuticular de cada planta permite a utilização destes marcadores para a estimativa da composição da dieta (Dove & Mayes, 2006).

A cera presente na superfície externa das plantas é uma mistura complexa de compostos lipídicos alifáticos. Os n-alcanos são hidrocarbonetos alifáticos saturados (C_nH_{2n+2}) de cadeia

longa, presentes na cera cuticular ou epicuticular das plantas, são relativamente inertes, de fácil análise, apresentam baixa digestibilidade e de uma maneira geral estão distribuídos uniformemente pela digesta durante a digestão e excreção (Mayes & Dove, 2006). Caracterizam-se por serem na sua maioria (> 90%) de cadeia ímpar, encontram-se normalmente entre C₂₅ (pentacosano) a C₃₅ (pentatriacontano), e os alcanos predominantes na maioria das espécies forrageiras são: C₂₉ (nonacosano), C₃₁ (hentriacontano) e C₃₃ (tritriacontano) (Dove & Mayes, 1991). Não são os únicos componentes presentes nas ceras cuticulares das plantas e até podem nem ocorrer em maior quantidade, existindo também: alcenos (alcanos de cadeia ramificada), monoésteres, álcoois primários, ácidos gordos de cadeia longa, cetonas, álcoois secundários, β-dicetonas, entre outros compostos (Dove & Mayes, 1996). A composição das ceras difere entre as diferentes espécies e partes de plantas e em menor medida variações advindas relativas ao estágio de crescimento (Dove, Mayes & Freer, 1996; Dove & Mayes, 2005). Segundo Dove *et al* (1996), as florescências e folhas das plantas têm tendência para apresentarem maiores concentrações de ceras, enquanto as raízes apresentam concentrações baixas (Roumet *et al*, 2006).

Normalmente, os n-alcanos de cadeia ímpar são utilizados como marcadores internos, enquanto os de cadeia par são usados como marcadores externos. Existem estudos sobre a aplicabilidade e limitações da metodologia dos n-alcanos em climas temperados, que foram vastamente revistos por Dove e Mayes, (1991); Dove e Mayes, (1996); Chen *et al*, (1999); e Dove e Mayes, (2005). A composição da dieta é estimada pela relação entre o teor de n-alcanos nas fezes e o teor de n-alcanos nas plantas presentes na dieta, após a correção dos valores para a recuperação fecal de n-alcanos. A recuperação fecal dos n-alcanos não é completa, como foi referido, e varia segundo o n-alcano, por isso a precisão da dieta estimada pode variar segundo os n-alcanos presentes na dieta (Dove & Moore, 1995; Dove & Mayes, 2005). Diferenças de recuperações fecais de n-alcanos relativo às idades, estado fisiológico e espécie animal devem ser considerados (Horn *et al*, 1964 citado em Oliveira & Prates, 2000; Ribeiro, 2008). A metodologia da extração dos n-alcanos baseia-se na saponificação direta das amostras. Hoje em dia esta técnica é relativamente rápida, e para a análise final das concentrações usa-se a técnica de cromatografia gasosa, o que oferece resoluções dos picos cromatográficos sobre um amplo perfil de comprimento da cadeia de carbonos dos n-alcanos. É imprescindível que a forragem amostrada (dieta) seja representativa (Oliveira & Prates, 2000).

A aplicação mais útil dos alcanos como marcadores em estudos em regime em pastoreio é a determinação da estimativa da composição botânica da dieta individual de cada animal (Dove & Mayes, 1996). A medição dos n-alcanos internos presentes nas fezes permite o cálculo das proporções das diferentes espécies de plantas constituintes da dieta, mesmo que a taxa de ingestão e digestibilidade sejam desconhecidas, o que se revela uma mais-valia, por permitir a estimativa da digestibilidade da dieta (Dove & Mayes, 1996). Mayes *et al*

(1994), e Dove (1998), obtiveram boas estimativas dos componentes da dieta em cabras e ovelhas com dietas conhecidas, no entanto em situações de elevada biodiversidade florística na dieta para os animais em estudo, como pastagens ou florestas, a estimativa de n-alcanos revelou-se menos confiável (Ali *et al*, 2004).

Estudos em equinos (Ferreira *et al*, 2007) e suínos (Dove & Mayes, 1996), onde realizaram a estimativa da composição da dieta através da técnica dos n-alcanos, apresentaram resultados favoráveis, com recuperações fecais elevadas (Dove & Mayes, 1996). Este método pode ser utilizado em diferentes herbívoros, ruminantes e não-ruminantes, e pode ser alargado para o estudo com várias espécies animais em pastagens partilhadas, o que permite uma maior compreensão do comportamento alimentar dos animais em regime de pastoreio e das interações entre eles, bem como uma melhor gestão da pastagem (Dove & Mayes, 1996).

III. Parasitas Gastrointestinais (GI) do Burro em pastoreio

1. Importância

O controlo do parasitismo GI é considerado um dos maiores problemas de animais herbívoros em regime extensivo, com grandes repercussões no estado de saúde e bem-estar animal (Ronchi & Narbone, 2003; Lisonbee, Villalba, Provenza & Hall, 2009; Scantlebury *et al*, 2013). O mesmo se tem verificado com os asininos (Gebread, 1999; Matthee, Krecek, Mil, Boshoff & Guthrie, 2002a). Por parasitismo entende-se uma relação entre duas espécies distintas, na qual uma é o parasita que obtém benefícios da associação trófica com um hospedeiro; ou seja o parasita alimenta-se do hospedeiro sem o destruir (Romero, 1990). Normalmente entre Hospedeiro-Parasita existe um equilíbrio aparente resultado de adaptações, mas caso haja um desequilíbrio pode resultar numa multiplicidade de síndromes inespecíficas e geralmente de carácter crónico, como mau estado geral, emagrecimento progressivo, diarreia aguda ou crónica, ausência de defecação, edemas, pelo em mau estado ou alopecias, anemia, icterícia, tosse/dispneia, cólicas, entre outros (Bowman, Lynn, Eberhard & Alcaraz, 2003; Madeira de Carvalho, 2006) e pode culminar na morte do hospedeiro (Romero, 1990). Esta situação pode ser responsável por graves perdas económicas devido ao parasitismo subclínico.

A gravidade dos quadros clínicos provocados pelos parasitas GI depende de vários fatores, dos quais é essencial referir: idade do hospedeiro (jovens e debilitados são os mais suscetíveis); carga parasitária e diversidade parasitária envolvida (Madeira de Carvalho, 2006).

À capacidade do hospedeiro conseguir competir contra os efeitos secundários do parasitismo pode usar-se o termo de resiliência, ou seja a capacidade do hospedeiro resistir ao ataque parasitário; e à capacidade do hospedeiro melhorar a resposta ao parasitismo,

como tentativa de limitar o desenvolvimento da população de parasitas, pode-se chamar de resistência (Coop & Kyriazakis, 2001). Segundo Reinemeyer (2009), o meio ambiente influencia mais que o próprio hospedeiro na transmissão das formas parasitárias. Existe referência para a inter-relação do estado nutritivo dos animais, manejo das pastagens e o parasitismo nos diferentes herbívoros (Coop & Kyriazakis, 2001; Ronchi & Narbone, 2003; Hutchings, Athanasiadou, Kyriazakis & Gordon, 2003). A nutrição é capaz de influenciar (modular) a capacidade de resistência do hospedeiro face às interações de nematodes GI. Esta situação é controlada pela imunidade adquirida de cada indivíduo, que irá depender da taxa de aquisição e do grau de expressão da imunidade (Kyriazakis & Houdijk, 2006). Desde há muito que se sabe que uma nutrição melhorada em proteínas pode aumentar a resiliência (caso reportado em ovelhas) e também ajusta a resistência. Como tal a imunonutrição pode integrar um papel vital na estratégia de controlo parasitário (Kyriazakis & Houdijk, 2006). Coop e Kyriazakis (2001), sugerem o possível efeito direto da nutrição sobre a população parasitária através da ingestão de compostos antiparasitários, integrantes na dieta.

O manejo das pastagens é fundamental, tanto para uma melhor gestão do controlo parasitário como para um melhor aproveitamento dos animais e do solo. Por isso a utilização das pastagens é influenciada pelo tipo de pastagem, sequeiro ou regadio, o estado vegetativo das plantas, a biodiversidade florística existente e as condições climáticas (variações de humidade e temperatura), as quais vão influenciar direta ou indiretamente, as fases parasitárias existentes e a sua capacidade de parasitar (Ronchi & Nardone, 2003). Também é necessário um encabeçamento equilibrado para a área de pastagem (segundo o IFAP (2014), aconselha 1-2 burro por hectare) e valorizá-la como alimento para uma melhor gestão dos recursos naturais oferecidos (Madeira de Carvalho, 2001; Hutching *et al*, 2003). O parasitismo em herbívoros é um problema com elevada ocorrência pois afeta o consumo de alimento (diminui) e posteriormente provoca alterações na absorção e no metabolismo bem como alteração da imunidade – falha da resistência do hospedeiro predispondo a outras doenças, tal como alteração da capacidade reprodutiva e atrasos de crescimento – daí a importância de controlar o parasitismo subclínico e para isso é fundamental controlar o bem-estar animal (Madeira de Carvalho, 2001; Hutching *et al*, 2003).

Os esquemas de controlo parasitário, muitas vezes são abordados como protocolos pré-definidos, sem recurso a técnicas de diagnóstico que são relativamente simples e baratas, permitem oferecer uma abordagem de tratamento mais perspicaz e objetivo de modo a evitar desparasitações desnecessárias, utilização de anti-helmínticos com espectro de ação muito amplos para a realidade do problema podendo promover possíveis resistências (Bowman *et al*, 2003; Madeira de Carvalho, 2006). É fundamental a conceção de programas baseados em evidências sustentáveis e ajuste dos protocolos de profilaxia em conjugação com medidas de manejo, higiene e sanidade básica (Kaplan & Nielsen, 2010; Arias *et al*,

2013). A utilização de fármacos de síntese (benzamidazóis, lactonas macrocíclicas e tetrahidropirimidinas), únicos ou combinados, apresentam limitações como o risco de resistências, custos insuportáveis para os países em desenvolvimento, risco de resíduos nos animais e efeitos ecotoxicológicos aquando da excreção para o meio ambiente (Coop & Kyriazakis, 2001). Segundo Waller (2006), citado por Lisonbee *et al* (2009), a resistência aos fármacos é o testemunho da flexibilidade biológica pela dependência e sobrevivência da espécie, neste caso dos nematodes, como resposta à exposição praticamente contínua a fármacos. Charles Darwin (Darwin, 1920) chama a isto, seleção natural. Os estudos para um controlo integrado são cada vez mais devido à necessidade de realizar uma abordagem alternativa pelo aumento de casos de resistências (Trawford & Mulugeta, 2008; Arias *et al*, 2013; Brady & Nichols, 2009; Reinemeyer, 2009). É importante salientar que este controlo, faz parte de uma abordagem multidisciplinar, e tem por base o conhecimento epidemiológico e a manutenção do equilíbrio Hospedeiro-Parasita e não se baseia na erradicação dos parasitas, que é praticamente impossível, podendo sim levar à redução da utilização dos anti-helmínticos, através de:

- Redução do seu uso para tratamentos estratégicos;
- Adequar a substância a utilizar segundo a espécie animal e a diversidade parasitária;
- Cálculo correto da dose a administrar;

Sem esquecer o objetivo do proprietário, pois permite também e adicionalmente, salvaguardar tradições do mundo rural e a preservação da paisagem.

Torna-se importante conhecer o tipo de parasitas existentes para uma melhor abordagem. Neste trabalho, será feita uma revisão apenas dos parasitas GI existentes na espécie asinina capazes de serem detetados segundo as técnicas de coprologia para uma melhor compreensão do trabalho prático realizado.

Segundo Trawford e Mulugeta (2008), os parasitas GI capazes de afetar o burro são os strongilídeos (pequenos e grandes estrôngilos), ascarídeos, tricostrongilídeos, oxiurídeos e cestodes anoplocefalídeos. Estes estão retratados na Tabela 2 segundo a taxonomia e com os géneros ou espécie segundo a bibliografia existente em Portugal.

Nestes últimos anos têm vindo a ser publicados alguns trabalhos no âmbito do parasitismo GI em asininos em Portugal (Sousa, Martins, Quaresma & Madeira de Carvalho, 2005; Madeira de Carvalho *et al*, 2007a; Duro, 2010; Sousa *et al*, 2010; Sousa, Nóvoa, Paz Silva & Madeira de Carvalho, 2012; Sousa, Nóvoa, Mora, Paz Silva & Madeira de Carvalho, 2013) que têm vindo a demonstrar e a concordar com a variedade de parasitas que afetam a população de asininos, face ao panorama do nosso país.

Tabela 2. Taxonomia referente a diversidade de helmintes encontrados em asininos, segundo a bibliografia existente em Portugal (adaptação de Soulsby, 1986).

Classe: NEMATODA		
Família	Subfamília	Género ou Espécie
Trichostrongylidae	Trichostrongylinae	<i>Trichostrongylus axei</i>
Strongylidae	Strongylinae "Grandes Estrongilídeos"	<i>Strongylus vulgaris</i>
		<i>Strongylus edentatus</i>
		<i>Strongylus equinus</i>
		<i>Oesophagodontus</i> spp.
		<i>Triodontophorus</i> spp.
	Cyathostominae "Pequenos Estrongilídeos"	<i>Poteriostomum</i> sp.
		<i>Gyalocephalus capitatus</i>
		<i>Cyathostomum sensu latum</i>
Oxyuridae		<i>Oxyuris equi</i>
Habronematidae		<i>Habronema</i> sp.
Ascarididae	Ascaridinae	<i>Parascaris equorum</i>
Classe: COCCIDEA		
Eimeriidae		<i>Eimeria</i> sp. <i>Eimeria leuckarti</i>

A alta incidência de parasitismo GI em asininos é bastante referida na bibliografia (Matthee, Krecek & Milne, 2000; Matthee *et al*, 2002a; Trawford & Mulugeta, 2008; Getachew, Trawford, Feseha & Reid, 2010), e revela uma maioria para parasitas da classe Nematoda, seguido dos Cestoda e Coccídeos do género *Eimeria*. A bibliografia refere que além da sua alta prevalência, são também a principal causa de doença e morte em asininos, sobretudo nos países em desenvolvimento. Segundo Lichtenfels, Kharchenko e Dvojnos (2008), e Getachew *et al* (2010), a importância e a incidência de multiparasitismo em asininos são elevados, o que também concorda com os resultados em Portugal.

2. Classe Nematoda

2.1. Trichostrongylidae

Da família Trichostrongylidae destaca-se a espécie *T. axei*, parasita do estômago dos equídeos, mas também pode parasitar os suínos e ruminantes. Parece haver uma maior suscetibilidade dos asininos a este parasita (Madeira de Carvalho *et al*, 2007a). Sousa (2009), refere uma maior suscetibilidade dos animais jovens.

O ciclo de vida é direto ou monoxeno, ou seja, só necessita do hospedeiro definitivo para completar o ciclo biológico. A fase parasitária não é migratória, apresenta um período pré-patente (PPP) de 25 dias, isto é o tempo necessário desde a infecção parasitária até à

manifestação dos sintomas (Urquhart *et al*, 1996). Os ovos embrionados e larvas do terceiro estágio larvar (L₃) possuem alta capacidade para sobreviver em condições adversas (resistem durante o inverno nas pastagens) (Bowman *et al*, 2003).

É responsável por provocar gastrite nos equinos com manifestação clínica de diarreia (casos de infecções massivas), mas normalmente provoca infecções assintomáticas (Urquhart *et al*, 1996; Bowman *et al*, 2003).

2.2. Strongylidae

Os nematodes da família Strongylidae, pertencentes à subfamília Strongylinae são designados por Grandes Estrôngilos ou Estrôngilos/Estrongilídeos dos Equídeos. Os membros deste género vivem no intestino grosso no estado adulto, tanto nos equinos como nos asininos, as formas larvares fazem migrações complexas no organismo do hospedeiro, e podem causar lesões graves. Há referências da existência da espécie *Strongylus asini* na zona Este de África (Lichtenfels *et al*, 2008). Os ovos são do tipo strongilídeos e os parasitas adultos são hematófagos e histófagos (Bowman *et al*, 2006). Madeira de Carvalho *et al* (2007a), constataram uma maior predisposição nas fêmeas e com idades avançadas para infecções com strongilídeos.

2.2.1. *Strongylus vulgaris*

Após a ingestão das L₃, estas penetram na mucosa intestinal e transformam-se em L₄ na submucosa, e atravessam a íntima das arteríolas da submucosa e fazem migrações contra a corrente sanguínea até chegar à artéria mesentérica cranial e seus ramos principais. Após vários meses mudam para L₅ e migram até ao intestino. Há formação de nódulos pelos adultos imaturos no interior das arteríolas, e quando rebentam, libertam os adultos no lúmen do intestino (cego e cólon) (Urquhart *et al*, 1996). A forma infetante é bastante dependente das condições climáticas, e pode-se considerar que qualquer pastagem do ano anterior contaminada por um equídeo parasitado é de supor que apresente larvas infetantes (Bowman *et al*, 2003). A elevada prevalência de *S. vulgaris* em asininos, segundo Madeira de Carvalho *et al* (2007a), e Getachew *et al* (2010), ocorre devido à falta de programas de desparasitação e causas como *stress* e desnutrição. Parece haver uma maior suscetibilidade em animais idosos (Wells, Krecek, Wells, Guthrie & Lourens, 1998; Sousa, 2009).

2.2.2. *S. edentatus*

Na presença de L₃ no intestino, após a ingestão passam para a mucosa intestinal com destino ao fígado pelo sistema porta. Alojaram-se em nódulos no parênquima hepático onde se transformam em L₄ e continuam as migrações hepáticas. As 6-8 semanas pós parasitismo abandonam o fígado pelo ligamento hepatorenal, e surgem larvas no peritoneu,

continuando as migrações até conseguirem chegar ao intestino grosso (Urquhart *et al*, 1996; Bowman *et al*, 2006). Segundo Wells *et al* (1998), este parasita somente afeta animais entre os 6 meses e os 3 anos de idade.

2.2.3. *S. equinus*

É uma espécie cujo o ciclo migratório ainda não é bem conhecido (Urquhart *et al*, 1996). Pensa-se que as L₃ após a ingestão, perdem a cápsula dentro do cego ou cólon e penetram na parede onde formam nódulos onde mudam para L₄, e estas seguem para o fígado onde fazem migrações pelo parênquima (cerca de 2 meses). Depois as L₄ e L₅ seguem para o pâncreas ou peritoneu e voltam para o intestino grosso. Quando atingem o estado adulto, localizam-se no lúmen intestinal onde realizam a cópula (Bowman *et al*, 2006). Apesar do comportamento invasivo das larvas, estão associadas a um baixo efeito patogénico (Urquhart *et al*, 1996).

2.2.4. *Oesophagodontus* spp.

É um parasita que nos últimos tempos tem vindo a ser identificado com maior frequência através das análises coprológicas, e é considerado como um parasita cosmopolita. (Lichtenfels *et al*, 2008)

2.2.5. *Triodontophorus* spp.

Parasita de carácter não migratório, surgem em grandes quantidades no cólon e contribuem para os efeitos prejudiciais de infecções mistas por estrôngilos. Podem chegar a provocar grandes úlceras (Urquhart *et al*, 1996).

2.2.6 Cyathostominae

Mais conhecidos por ciatostomíneos ou pequenos estrôngilos, também pertencentes a família Strongylidae, são os parasitas mais frequentes. É comum encontrar entre 10-20 espécies deste parasita no mesmo hospedeiro (Lichtenfels *et al*, 2008, Bowman *et al*, 2003) e segundo Madeira de Carvalho, Afonso-Roque e Fazendeiro (2003), os estrongilídeos são helmintes que utilizam o parasitismo em grupo para a sua sobrevivência. Apesar do género *Cyathostomum* ser dos mais frequentes, também surgem outros géneros, como o *Cylicocyclus* com espécies tipicamente parasitas dos asininos (como *C. auriculatus*, *C. asinini*) (Matthee *et al*, 2000; Matthee *et al*, 2002a). Até ao momento, existem mais de 50 espécies de ciatostomíneos que foram identificados nos equídeos, e pelo menos 10 espécies foram identificadas como exclusivas dos burros e zebras (Kuzmina & Kuzmin, 2007; Trawford & Mulugeta, 2008; Lichtenfels *et al*, 2008).

Segundo Getachew *et al* (2010), na Etiópia e no Reino Unido, e segundo Sousa *et al* (2013), em Portugal, a ciatostominose é o problema mais frequente em asininos. Sendo atualmente

considerados os estrongilídeos mais importantes dos equídeos, por um lado por estarem associados a situações de elevada morbidade caracterizados por cólicas graves, diarreia persistente, anorexia, perda de peso e até mortalidade, e por outro lado estarem associados a resistências antiparasitárias nos países desenvolvidos (Urquhart *et al*, 1996; Love, Murphy & Mellor, 1999; Trawford & Mulugeta, 2008). Podem também provocar hiperlipemia em burros (Trawford & Mulugeta, 2008). Afetam equinos e asininos, que são infetados após a ingestão das L₃ presentes na pastagem, água ou alimento, e no estado adulto localizam-se no cego e cólon, fixados à mucosa (Bowman *et al*, 2006). O ciclo de vida é direto, e em duas semanas há a eclosão dos ovos e desenvolvimento da L₃ aquando de verões de regiões temperadas, e além disso os ovos apresentam grande capacidade de resistência ao meio ambiente. As larvas L₃ são histófagas e também há evidências de capacidade de hipobiose já dentro do organismo do hospedeiro permanecendo na mucosa do intestino grosso até à primavera (Urquhart *et al*, 1996; Love *et al*, 1999). E segundo Love *et al* (1999), os mecanismos de sobrevivência dos ciastostomíneos dependem não só das condições ambientais, como da imunidade e do grau de infeção do hospedeiro.

É uma parasitose comum em animais jovens que são criados em pastoreio, havendo dois picos de infeção, um no início da primavera com as larvas que sobreviveram ao inverno e outro, mais importante, com os ovos eliminados aquando do início do pastoreio e os níveis larvares aumentam circunstancialmente com a chegada do verão (Madeira de Carvalho *et al*, 2007a; Trawford & Mulugeta, 2008).

2.3. Oxyuridae

A espécie *Oxyuris equi*, é um endoparasita dos equinos e asininos. A visualização de ovos através das técnicas parasitológicas é rara, no entanto pode ser mais facilmente diagnosticado pela observação da sintomatologia (irritação anal, stress provocado por essa irritação, alopecia na parte superior da cauda), visualização de estrias gelatinosas branco-amareladas na zona perineal, e pela recolha de material do períneo com fita adesiva com posterior visualização ao microscópico (Trawford & Mulugeta, 2008). A sintomatologia deve-se sobretudo às fêmeas parasitas quando se localizam na zona perineal durante a oviposição (Urquhart *et al*, 1996).

2.4. Habronematidae

As espécies de referência em burros são as seguintes: *Habronema muscae*, *H. majus* e *Drashia megastoma*. Apresentam um ciclo de vida indireto, onde o hospedeiro intermediário pode ser a mosca dos estábulos – espécie *Stomoxys calcitrans*, ou a mosca doméstica – espécie *Musca domestica*. Após a eliminação dos ovos ou L₁ a partir das fezes, estes são ingeridos pelas formas larvares dos vários muscídeos. O desenvolvimento da forma

infetante (L₃) ocorre paralelamente com o desenvolvimento do hospedeiro intermediário. Quando o hospedeiro intermediário atinge a forma adulta, infetam o hospedeiro definitivo pela deposição das formas infetantes através das peças bucais, que podem ser deglutidas quando são depositadas em redor da boca, ou pela deglutição do próprio hospedeiro intermediário. O parasita completa o seu ciclo, no estômago (na parte glandular) dos equinos e asininos. Também está descrita um outro percurso das larvas, em fundo de saco, quando estas são depositadas em feridas cutâneas ou ao redor dos olhos, conseguindo apenas invadir os tecidos adjacentes (Urquhart *et al*, 1996; Trawford & Mulugeta, 2008). As lesões mais relevantes por este parasita são as lesões granulomatosas de habronemose cutânea, conjuntivite persistente, e além disso, o género *Habronema* pode causar uma gastrite hemorrágica, que se revela sem interesse patológico pela ausência de sintomatologia, mas altera a dinâmica normal do estômago (Trawford & Mulugeta, 2008).

2.5. Ascarididae

Parascaris equorum, helminte pertence à família Ascaridae. O ciclo de vida deste nematode é directo, e após a ingestão e eclosão das L₃, estas penetram na parede intestinal e em 48h estão no fígado do hospedeiro. Às duas semanas, chegam aos pulmões, onde migram para os brônquios e a traqueia, sendo deglutidos e retornam ao intestino delgado. As fêmeas são altamente fecundantes e os ovos têm elevada resistência no meio ambiente. Ao contrário do que se pensa para os equinos (infecções somente em jovens), nos burros pode haver infecções mesmo em adultos, que se associa a uma falta de adaptação dos asininos a este parasita por não desenvolverem imunidade durante o crescimento (casos reportados na África do Sul por Matthee *et al* (2000) e Getachew *et al* (2010)). As infecções normalmente ocorrem com contaminação das mesmas pastagens pelos burrancos ano após ano (Trawford & Mulugeta, 2008). Podem provocar cólicas, hepatite, problemas respiratórios e diarreia (Trawford & Mulugeta, 2008). Deve-se ter em conta a resistência dos ovos ao meio ambiente que pode ser durante anos. A remoção das fezes pode ser das únicas abordagens preventivas com bom resultado (Trawford & Mulugeta, 2008).

2.6. Strongyloididae

Uslo e Guçlu (2007), e Getachew *et al* (2010), referem também a presença de *Strongyloides westeri*, uma strongiloidose que pode ocorrer em poldros e burrancos com idades até aos 6 meses e a infecção latente pode ser transmitida pelas mães aleitantes através do leite. Após esta idade é auto-limitante, sendo de pouca relevância patogénica, ainda que possa provocar uma enterite grave (Urquhart *et al*, 1996; Trawford & Mulugeta, 2008).

3. Classe Coccidea

3.1. Eimeriidae

Nos equinos, asininos e muares, o agente etiológico de enterite por protozoários pertence à espécie *Eimeria leuckarti* (Madeira de Carvalho *et al*, 2007a; Uslo & Guçlu, 2007). Esta espécie ocorre no intestino delgado e é referida como causa de diarreia intermitente (Bowman *et al*, 2003).

4. Classe Cestoda e Trematoda

Trawford & Mulugeta (2008) e Getachew *et al* (2010), apesar de encontrarem cestodes nos asininos, referem que a sua prevalência é baixa em análises coprológicas. Segundo a bibliografia consultada, há referências na Turquia (Ulso & Guçlu, 2007), África do Sul (Matthee *et al*, 2000) e Etiópia (Getachew *et al*, 2010; Abebew, Endebu & Gizachew, 2011). São três espécies do género *Anoplocephala* que podem parasitar os equinos e asininos: *Anoplocephala magna*, *A. perfoliata* e *Paranoplocephala mamillana* e apresentam um ciclo indireto, com um hospedeiro intermediário, um ácaro oribatídeo.

Da Classe dos Trematodes, também há referência dos géneros e espécies *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Dicrocoelium* spp. e *Gastrodiscus* spp. (Wells *et al*, 1998; Matthee *et al*, 2000; Trawford & Mulugeta, 2008; Getachew *et al*, 2010; Abebew *et al*, 2011; Mezgebu, Tafess & Tamiru, 2013).

Tabela 3. Tabela esquemática sobre a diversidade de parasitismo relevante em asininos, destacando características do ciclo biológico, método de diagnóstico e referência de observação bibliográfica.

Género ou Espécie		Localização no Hosdeiro	PPP	Forma infectante	Tipo de ciclo	Sintomas	Métode de diagnóstico	Referências de observação
NEMATODES								
<i>Trichostrongylus axei</i>		Estômago ³	25 dias ^{1,2}	L ₃ (capacidade hipobiose) ^{1,2}	Directo ou Monoxeno ²	Assintomática, debilitante, diarreia ¹	Flutuação (ovos); Copropocultura (L3) ^{1,3}	Wells <i>et al</i> (1998), Matthee <i>et al</i> (2002), Ayele <i>et al</i> (2006), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Getachew <i>et al</i> (2010), Sousa <i>et al</i> (2010), Duro (2010), Abebew <i>et al</i> (2011), Sousa <i>et al</i> (2012)
Grandes Estrongilídeos	<i>Strongylus vulgaris</i>	Intestino Grosso ³	6-7 meses ^{1,2}	L ₃ ²	Directo ou Monoxeno ²	Cólica trombo- embólica, atrite, trombose ^{1,2}	Flutuação (ovos); Copropocultura (L3) ¹	Wells <i>et al</i> (1998), Matthee <i>et al</i> (2000), Matthee <i>et al</i> (2002), Binev <i>et al</i> (2005), Ayele <i>et al</i> (2006), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Uslo & Guçlu (2007), Kuzmina & Kumin (2008), Getachew <i>et al</i> (2010), Sousa <i>et al</i> (2010), Duro (2010), Abebew <i>et al</i> (2011), Sousa <i>et al</i> (2012)
	<i>Strongylus equinus</i>		8-9 meses ^{1,2}					Wells <i>et al</i> (1998), Matthee <i>et al</i> (2000), Getachew <i>et al</i> (2010), Abebew <i>et al</i> (2011)
	<i>Strongylus edentatus</i>		10-12 meses ^{1,2}					Wells <i>et al</i> (1998), Matthee <i>et al</i> (2000), Matthee <i>et al</i> (2002), Binev (2005), Ayele <i>et al</i> (2006), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Uslo & Guçlu (2007), Kuzmina & Kumin (2007), Getachew <i>et al</i> (2010), Duro (2010), Abebew <i>et al</i> (2011)
	<i>Oesophagodontus robustus</i>		45 dias ¹	L ₃ (capacidade hipobiose) ^{1,2}		Diarreia fétida ¹		Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Sousa <i>et al</i> (2010), Getachew <i>et al</i> (2010), Sousa <i>et al</i> (2012)
	<i>Triodontophorus</i> spp.		3-6 meses ¹	L ₃ ²		úlceras ²		Matthee <i>et al</i> (2000), Binev (2005), Ayele <i>et al</i> (2006), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Uslo & Guçlu (2007), Getachew <i>et al</i> (2010), Sousa <i>et al</i> (2010), Duro (2010), Abebew <i>et al</i> (2011), Sousa <i>et al</i> (2012), Cunha (poster)
Ciostomíneos	<i>Poteriostomum</i> spp.		2-4 meses ¹	L ₃ (capacidade hipobiose) ¹	Directo ou Monoxeno ²	diarreia crónica, cólicas graves, hiperlipidémia, anorexia e perda de peso ³	Flutuação (ovos); Copropocultura (L3) ^{1,3}	Binev (2005), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Uslo & Guçlu (2007), Getachew <i>et al</i> (2010), Sousa <i>et al</i> (2010), Sousa <i>et al</i> (2012)
	<i>Gyalocephalus capitatus</i>							Binev (2005), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Getachew <i>et al</i> (2010), Duro (2010), Sousa <i>et al</i> (2010), Sousa <i>et al</i> (2012)
	<i>Cyathostomum sensu latum</i>							Sotiraki (1997), Eysker & Pandey (1988), Matthee <i>et al</i> (2000), Matthee <i>et al</i> (2002), Binev (2005), Ayele <i>et al</i> (2006), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Kuzmina & Kumin (2008), Getachew <i>et al</i> (2010), Sousa <i>et al</i> (2010), Duro (2010), Abebew <i>et al</i> (2011), Sousa <i>et al</i> (2012), Cunha (poster)

Legenda: ¹Bowman *et al*, 2003; ²Urquhart *et al*, 1996; ³Trawford e Mulugeta, 2008; * Necrópsia; ¹ dados não publicados

Tabela 4. Tabela esquemática sobre a diversidade de parasitismo relevante em asininos, destacando características do ciclo biológico, método de diagnóstico e referência de observação bibliográfica (continuação).

Género ou Espécie	Localização no Hosdeiro	PP	Forma infectante	Tipo de ciclo	Sintomas	Método de diagnóstico	Referências de observação
NEMATODES							
<i>Strongyloides westeri</i>	Intestino Delgado	14 dias ²	L ₃ ou L ₄ , via transmamária ¹	autoinfecção interna ou externa (pele) ¹	Diarreia ¹	Flutuação (Ovos embrionados) ³	Sotiraki (1997), Wells <i>et al</i> (1998), Matthee <i>et al</i> (2002), Ayele <i>et al</i> (2006), Uslo & Guçlu (2007), Getachew <i>et al</i> (2010), Cunha (poster), Abebew <i>et al</i> (2011)
<i>Parascaris equorum</i>	Intestino Delgado ³	10 semanas ^{1,2}	ovos com L ₃ ¹	Directo ou Monoxeno ¹	colicas, alt.respiratorias, diarreia, mal estado geral e atraso no crescimento ¹	Flutuação (Ovos) ¹	Wells <i>et al</i> (1998), Matthee <i>et al</i> (2000), Matthee <i>et al</i> (2002), Ayele <i>et al</i> (2006), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Uslo & Guçlu (2007), Getachew <i>et al</i> (2010'), Abebew <i>et al</i> (2011), Mezgebu <i>et al</i> (2013)
<i>Oxyuris equi</i>	Intestino Grosso ² , ceco cólon e recto ¹	4-5 meses ^{1,2}	ovos com L ₃ ¹	Directo ou Monoxeno ^{1,2}	erritação com prurido perianal durante a oviposição, alopecia e inflamação da zona ^{1,2}	Sintomatologia (prurido + fio de ovos pendurado na zona anal); flutuação ^{1,3}	Wells <i>et al</i> (1998), Matthee <i>et al</i> (2000), Matthee <i>et al</i> (2002), Ayele <i>et al</i> (2006), Uslo & Guçlu (2007), Getachew <i>et al</i> (2010), Abebew <i>et al</i> (2011), Mezgebu <i>et al</i> (2013)
<i>Habronema muscae</i> , <i>H. microstoma</i>	Estômago ¹	2 meses (?) ²	L ₃ ¹	Heteroxeno (<i>Musca</i> , <i>Stomoxys</i> e <i>Haematobia</i>) ¹	Praticamente ausente na habronemose gástrica ¹	Difícil segundo técnicas de diagnóstico ^{1,3}	Matthee <i>et al</i> (2000)*, Matthee <i>et al</i> (2002)*, Getachew <i>et al</i> (2010)*, Sousa ¹
COCCIDEAS							
<i>Eimeria</i> sp <i>Eimeria leuckarti</i>	Intestino Delgado ³	30 dias ¹	Ooquistos ¹	Directo ¹	Diarreia intermitente ¹	Sedimentação (Oocisto) ^{1,2}	Sotiraki (1997), Madeira de Carvalho <i>et al</i> (2007a), Uslo & Guçlu (2007), Getachew <i>et al</i> (2010), Cunha (poster)
CESTODES							
<i>Anoplocephala magna</i>	Intestino Delgado ³						Ayele <i>et al</i> (2006), Uslo & Guçlu (2007), Getachew <i>et al</i> (2009)
<i>Anoplocephala perfoliata</i>	Válvula íleo-cecal; intestino grosso ³		Cistecercóide ¹	Indirecto ou heteroxeno ²	Diarreia persistente, cólica ¹	Flutuação ou sedimentação (Ovos) ^{1,3}	Ayele <i>et al</i> (2006), Matthee <i>et al</i> (2000), Uslo & Guçlu (2007), Getachew <i>et al</i> (2010)
<i>Paranoplocephala mamillana</i>	I. Delgado; Estômago ³						Ayele <i>et al</i> (2006), Getachew <i>et al</i> (2010)

Legenda: ¹Bowman *et al*, 2003; ²Urquhart *et al*, 1996; ³Trawford e Mulugeta, 2008; * Necrópsia; ¹ dados não publicados.

PARTE 2 – Trabalho Experimental

IV. Objectivos

Existem poucos estudos e muitas incertezas sobre a alimentação dos burros, não sendo conhecido qualquer trabalho realizado em regime de pastoreio de acordo com as características do nosso país, em particular com a flora existente na região de Trás-os-Montes. A partir deste facto, o nosso projeto teve os seguintes objetivos:

- Observar e compreender o comportamento alimentar de um grupo de burras da raça de Miranda sujeitas a regime de pastoreio livre num lameiro típico de Trás-os-Montes.
- Estimar a composição da dieta seleccionada pelos asininos numa pastagem heterogénea através do método dos n-alcanos.
- Análise do parasitismo gastrointestinal (GI) em três fases ao longo do período experimental (02 de junho, 02 de julho e 22 de julho de 2013), procedendo à determinação do grau de infeção e de biodiversidade parasitária.

V. Material e Métodos

1. Caracterização da área de estudo

1.1. Localização da área de estudo (Anexo 1)

O estudo experimental foi levado a cabo no nordeste Transmontano, na aldeia de Atenor, que se situa numa área contígua ao Parque Natural do Douro Internacional, a cerca de 5 Km de distância da vila de Sendim, do concelho de Miranda do Douro, Portugal (41°24'48.12"N; 6°29'15.38"O), a uma altitude de 651 metros em relação ao nível do mar. O estudo decorreu entre 25 de maio e 22 de julho de 2013.

1.2. Descrição da área de estudo

A área de estudo apresenta-se como um lameiro em Trás-os-Montes, com as características de regadio imperfeito, tendo sido, no passado, utilizado como um Lameiro de Feno, servindo de pastagem para bovinos. Apresenta uma área de cerca de 1,6 hectares (ha) e caracteriza-se como um lameiro típico do planalto mirandês, isto é: área relativamente pequena com uma zona pastável e zona arbustiva, vedado por um muro de pedra e compartimentado por carvalhos-roble (*Quercus robur* L.), freixos (*Fraxinus angustifolia* Vahl subsp. *angustifolia*), giestas (*Cytisus* spp.) e pilriteiros (*Crataegus monogyna* Jacq.), que também conferem uma proteção fundamental contra os ventos. O lameiro foi dividido em seis zonas para facilitar as observações (Tabela 5; ver também Anexo 1 e Anexo 7).

A vegetação natural (arbustiva e arbórea) inclui além das mencionadas anteriormente, as seguintes plantas: azinheira (*Quercus ilex* L.), carrasco (*Quercus pyrenaica* Willd.), carvalho-cerquinho (*Quercus faginea* Lam.), olmo (*Ulmus* L.), choupo-branco (*Populus alba* L.), silvas (*Rubus* sp.), roseira brava (*Rosa* sp.), macieira silvestre (*Prunus* sp.) e madressilva (*Lonicera* sp.). Relativamente ao estrato herbáceo: predominam as gramíneas (*Bromus* sp., *Dactylis glomerata* L., *Lolium* sp., *Briza* sp., *Calamagrotis* sp., *Avena* sp., *Cynosurus* sp., *Agrostis* sp.). Identificaram-se os seguintes géneros de leguminosas: *Lathyrus* sp., *Trifolium* sp., *Ononis* sp., *Anthyllis* sp., e *Vicia* sp. E adicionalmente, identificaram-se outras plantas dos seguintes géneros: *Plantago* sp., *Teucrium scorodonia* L., *Clinopodium vulgare* L., *Aristolochia paucinervis* Pomel, *Rununculus* sp., *Thapsia villosa* L., *Tordylium maximum* L., *Chaerophyllum hirsutum* Roseum, *Carduus tenuiflorus* Curtis, *Taraxacum officinale* Wiggers, *Hypochaeris* sp., *Linum bienne* Mill., *Linum catharticum* L., *Hypericum* sp., *Sanguisorba* sp., *Potentilla reptans* L., *Scilla verna* Huds., *Allium* sp., *Stellaria graminea* L., *Petrorhagia nanteuillii* (Burnat) P.W.Ball e Heywood, *Geranium molle* L., *Capsella bursa pastoris* (L.) Medik., *Convolvulus arvensis* L., *Galium Aparine* L. (Anexo 2).

Tabela 5. Descrição das zonas divididas no lameiro segundo a área (ha) e sua proporção (%).

Zonas	Área (ha)	Área (%)	Área herbáceas	% Área herbáceas	Área Arbustiva	% Área Arbustivas
Zona 1	0,244	15,33%	0,197	80,44	0,048	19,56
Zona 2	0,262	16,43%	0,208	79,44	0,054	20,56
Zona 3	0,170	10,64%	0,110	64,80	0,060	35,20
Zona 4	0,156	9,78%	0,078	49,76	0,078	50,24
Zona 5	0,239	14,99%	0,112	46,90	0,127	53,10
Zona 6	0,523	32,82%	0,185	35,43	0,338	64,57
Total	1,593	100%	0,889	55,81	0,705	44,19

2. Caracterização climática

O clima da região caracteriza-se por uma zona de menor influência atlântica, por isso uma com maior influência mediterrânica e continental; concretamente é classificado segundo a carta do nordeste de Portugal (1991), como zona da terra fria do planalto de Trás-os-Montes (Pires *et al*, 1994). Os invernos são caracterizados por serem longos e frios, com temperaturas a atingir valores abaixo de zero. Os verões são curtos e quentes, com temperaturas bastante altas (acima dos 35°C) durante o dia contrastando com noites frias (AEPGA, 2012). Em Miranda do Douro, onde se situa a estação climatológica mais próxima, com a seguinte localização: 41°30'N, 06°17'O, a uma altitude de 693m, regista-se uma

precipitação média anual de 554,7 mm e uma temperatura média anual de 12°C, com mínima de 4,2°C em janeiro e máxima de 21,1°C em julho, segundo o Instituto da Conservação da Natureza – ICN (2001). Existe uma grande ocorrência de geadas até aos fins de maio. No ano em concreto do presente estudo, observou-se o prolongamento das chuvas até bastante mais tarde que o normal (fins de maio), o que permitiu realizar o estudo nas datas referidas com uma diversidade florística bastante alta. Durante os meses concorrentes com o estudo experimental, segundo o Boletim Climatológico Mensal do Instituto Português do Mar e da Atmosfera – IPMA (2013), o mês de junho foi caracterizado como seco a muito seco e com uma grande variabilidade da temperatura. O valor médio da temperatura foi de 15,3°C, ligeiramente inferior ao valor normal, e o valor médio da precipitação mensal foi de 15,7mm, este também abaixo da média. Relativamente ao mês de julho, apresentou uma onda de calor na primeira quinzena do mês caracterizada pela persistência do aumento da temperatura mínima, tendo sido também um mês seco. Ainda neste período no local do estudo Atenor – Sendim, sofreu grande instabilidade atmosférica, com ocorrência de aguaceiros e trovoadas (dia 11 de julho). O valor médio da temperatura do ar foi de 23,4°C (valor localizado ligeiramente acima do valor normal), e o valor médio da precipitação foi de 7,0 mm (inferior à média).

3. Animais, Maneio e Delineamento Experimental

3.1. Animais

Foram utilizadas neste estudo 8 burras alfeiras e de idade adulta da raça de Miranda, entre os 5 e 9 anos de idade. Todos os animais foram submetidos a um exame físico geral com observação dos cascos e condição corporal. Este grupo de burras foi submetido a desparasitação em Janeiro com ivermectina, via subcutânea, e o seu historial parasitológico do ano anterior, bem como do ano do presente estudo (para além do nosso período de trabalho), foram facultados gentilmente pelo Dr. Sérgio Sousa. O grupo foi identificado com coleiras de diferentes números para que à observação fosse de fácil identificação (Tabela 6).

Tabela 6. Descrição do grupo de animais em estudo, segundo o nome, número de *microchip*, ano de nascimento e identificação.

	Nome	Nº <i>Microchip</i>	Ano de Nascimento	Identificação
1	Algosa	941000002462396	2005	Coleira azul nº848
2	Belfa	941000002463753	2006	Coleira azul nº7
3	Bruçó	985120032934673	2006	Coleira azul nº55
4	Castanha	985120032746032	2007	Coleira azul nº99
5	Dulcineia	941000003153916	2008	Coleira azul nº64
6	Ennie	982000161047738	2008	Coleira azul nº5
7	Especiosa	985120032955088	2005	Coleira azul nº 0
8	Maceda	941000003157576	2005	Coleira azul nº888

No início e no fim do estudo, procedeu-se à avaliação da condição corporal segundo o sistema de avaliação proposto pelo *Donkey Sanctuary*. Este sistema utiliza uma escala de 1 a 5, sendo o 1 – magro, 2,5-3 – ideal e 5 – obeso (Smith & Wood, 2008).

3.2. Maneio

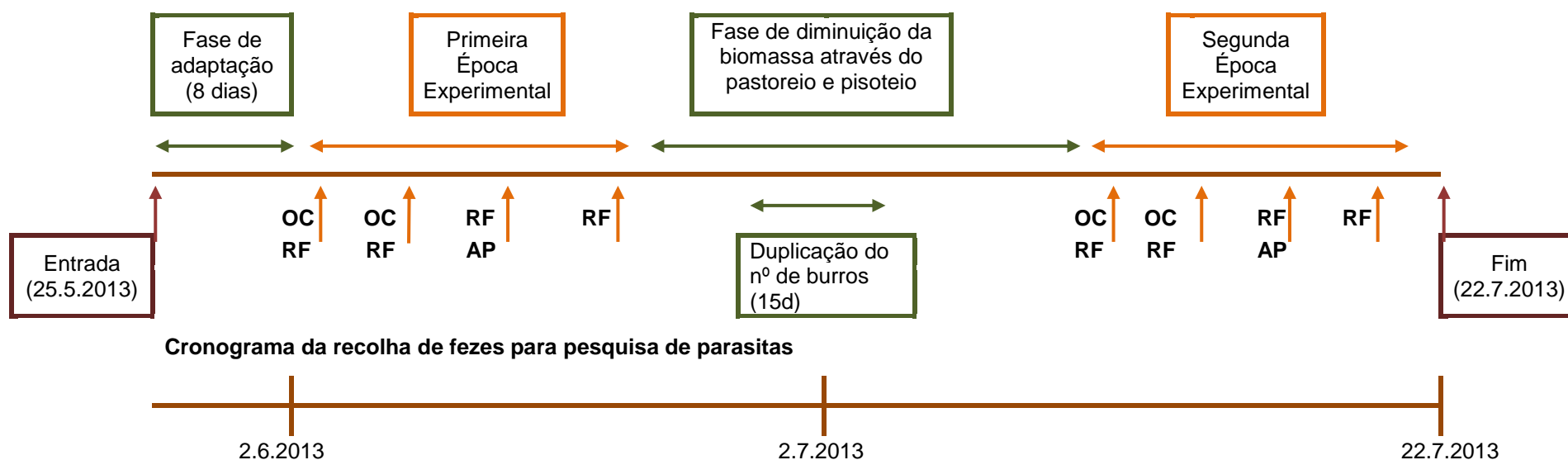
As burras foram observadas durante dois meses (desde fim de maio até meio de julho de 2013), onde todos os dias desde o amanhecer, eram levadas desde o local onde passavam a noite – *Regada* – Atenor, até ao referido lameiro e recolhidas ao fim do dia. A alimentação dos animais durante o período de estudo foi exclusivamente a pastagem do lameiro em estudo. No lameiro colocou-se um depósito-reservatório de água potável com capacidade para 1000 litros, que era renovada a cada 5 ou 6 dias consoante o consumo.

Inicialmente, o estudo compreendeu um período pré-experimental, com objetivo de adaptar os animais ao novo ritmo diário, alimentação e interação intra-espécie do grupo, com uma duração de 8 dias (25 de maio a 02 de junho de 2013).

3.3. Delineamento Experimental

Na Figura 3, apresentamos o cronograma do nosso trabalho. Durante o período de 25 de maio a 22 de julho os animais estiveram todos os dias no lameiro (desde o amanhecer até o anoitecer). O estudo foi dividido em duas épocas experimentais, de 4 dias cada (Figura 3). A primeira época foi efetuada de 3 a 6 de junho, e a segunda época de 17 a 20 de julho. O objetivo de efetuar duas épocas foi o de obter disponibilidades diferentes de alimento na pastagem, podendo levar a comportamentos alimentares diferentes. Em ambas as épocas foram efetuadas recolhas de pastagem, fezes e observação comportamental.

Figura 3. Cronograma do trabalho realizado.



Legenda: **OC** – Observação comportamental; **RF** – Recolha de fezes bdiária para marcadores (início da manhã e fim de tarde); **AP** – Amostragem da pastagem.

4. Análise do comportamento em pastoreio e seleção da dieta

O comportamento alimentar dos animais foi observado em 2 dias consecutivos em cada uma das duas épocas estudadas (Figura 3). A atividade dos animais (pastoreio vs. não pastoreio) foi registada a cada 15 min durante o período de luz (isto é, do amanhecer ao anoitecer), tendo assim sido contabilizado o número de minutos e/ou horas de pastoreio diário (Anexo 3). Em ambos os períodos experimentais, realizou-se a colheita bi-diária de fezes para estimativa da dieta selecionada através da deteção de n-alcanos. No terceiro dia de cada ciclo do estudo (05 de junho e 19 de julho) efetuou-se a recolha das plantas selecionadas pelo grupo em estudo, para a sua identificação, na procura de possíveis preferências. No segundo ciclo, esta recolha foi dificultada pelo pisoteio e pastoreio contínuos. De facto, com o objetivo de diminuir a disponibilidade de alimento do primeiro para o segundo ciclo, as burras continuaram a ir ao lameiro e durante 14 dias (19 de junho a 02 de julho) duplicou-se o número de animais (juntanto machos castrados da raça asinina de Miranda com idade compreendida entre os 5 e 9 anos de idade).

5. Amostragem da pastagem

Realizou-se a recolha sistemática de amostras da vegetação com corte a 1-1,5 cm do solo com um retângulo de 50X25 cm ao longo da área pastável, com o objetivo de obter:

- Altura aproximada da pastagem usando uma régua;
- Biomassa aproximada de cada zona expressada em ton MS/ha;
- Medição da composição química da vegetação, que incidiram com o dia anterior ao início de cada época de observações (dia 02 de junho e 16 de julho);
- Quantificação de n-alcanos, que incidiram com o terceiro dia de cada época (dia 05 de junho e 19 de julho).

Estas amostras foram pesadas, identificadas e posteriormente congeladas até à realização das provas laboratoriais.

6. Amostragem e colheita de fezes

As colheitas de amostras de fezes foram efetuadas no campo após a visualização individual de cada burro a defecar, garantindo assim a identificação, evitando o possível comprometimento da origem das fezes e recolhendo apenas as porções superficiais e interiores. As amostras de fezes para o controlo do perfil parasitológico, foram acondicionadas em sacos de plástico, mantidas em refrigeração, após prévia identificação (nome da burra, data e época do estudo), enquanto as amostras para a estimativa da dieta selecionada foram armazenadas numa arca congeladora, após prévia identificação.

7. Análises químicas

7.1. Preparação das amostras para análise laboratorial

Após a recolha das amostras de fezes e dos componentes vegetais, as amostras foram submetidas a um processo de secagem em estufas com ventilação forçada a 60°C durante 72 horas, para a determinação do seu teor em MS, sendo posteriormente moídas por um crivo de 1mm.

7.2. Análises químicas

Para a determinação dos parâmetros matéria orgânica (MO), cinzas, proteína bruta (PB), pelo método de Kjeldahl, foram seguidos os procedimentos recomendados pela AOAC (1990). A determinação dos constituintes da parede celular – fibra do detergente neutra (NDF), fibra do detergente ácida (ADF) e lenhina do detergente ácida (ADL) – foi efetuada com base nos métodos propostos por Robertson e Van Soest (1981), e nas modificações introduzidas por Mascarenhas-Ferreira *et al* (1983) (Anexo 4). A diferença entre as concentrações da fração NDF e da fração ADF foi utilizada como medida do teor em hemicelulose. A concentração de celulose foi calculada por diferença entre a fração ADF e a fração ADL.

7.3. Análise de fenólicos totais e taninos

O teor em fenólicos totais e taninos foi também determinado, em duplicado, nas amostras de vegetação arbustiva utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu em combinação com polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP) tal como sugerido por Makkar, Blummel, Borowy e Becker (1993). A diferença entre os valores de fenólicos totais e fenólicos simples representou o teor em taninos totais e foi expresso em equivalente de ácido tânico.

7.4. Doseamento dos n-alcanos

O doseamento dos n-alcanos foi efetuado de acordo com a metodologia proposta por Mayes, Lamb e Colgrove (1986), com as modificações introduzidas por Oliván e Osoro (1999) (Anexo 4). A primeira etapa envolveu uma saponificação de 0,5 g de fezes e 1,5 g de alimento durante 14 horas em 7 ml de hidróxido de potássio (KOH) 1M em etanol. Posteriormente, foi efetuada a extração a quente (65°C) com n-heptano (Oliván & Osoro, 1999). Após a extração, a amostra foi filtrada através de uma coluna de sílica-gel de 5 ml, para remoção de pigmentos, álcoois e lípidos. Posteriormente, procedeu-se à recuperação com n-heptano e à concentração da amostra a 500 µl para análise cromatográfica. Os n-alcanos foram determinados por cromatografia gasosa, num cromatógrafo Perkin Helmer Clarus 580, equipado com um detetor de ionização de chama (FID), um injetor automático,

de temperatura programável, uma coluna SGE de 50 m de comprimento x 0,220 mm de diâmetro interno. Utilizou-se como gás de arraste o hélio (He) a um fluxo 2 ml min.⁻¹. As temperaturas, durante a análise cromatográfica, foram as seguintes: injetor (280°C); coluna (170°C, durante 4 min., 30°C min.⁻¹ até se atingir 215°C e mantém durante 1 min., 6°C min.⁻¹ até 300°C e mantém durante 40 min.). O detector FID foi mantido a 340°C. A identificação foi efetuada por comparação dos tempos de retenção dos componentes da amostra com os dos padrões previamente injetados. A quantificação dos n-alcanos foi realizada pelo método do padrão interno (C₂₂ e C₃₄, adicionados no início do processo de extração). A utilização de dois padrões permitiu avaliar a eficácia do processo de extração e corrigir as áreas dos picos com base na relação entre os dois n-alcanos (C₂₂ e C₃₄). As análises dos alimentos e fezes foram efetuadas em duplicado e os valores reportados à MS.

8. Técnicas parasitológicas para detecção de Parasitas GI

8.1. Método de McMaster

Em todas as amostras executou-se a técnica quantitativa de McMaster, segundo o método de Thienpont, Rochette e Vanparijs (1986), e Madeira de Carvalho (2001) (Anexo 5), que permite avaliar a prevalência e o grau de infeção parasitária. É de notar que esta técnica apresenta um limiar de deteção, que são 50 ovos por grama de fezes (OPG), sendo considerado neste estudo os valores inferiores a 50 OPG como “Negativo” e valores iguais ou superiores a 50 OPG como “Positivo”. Para considerar uma amostra realmente negativa a nível parasitário, as provas quantitativas e qualitativas, bem como a coprocultura, terão de ser negativas.

Segundo o protocolo de desparasitação da AEPGA efectuado pelo Dr. Sérgio Sousa (proposto por Sousa *et al*, 2010), realiza-se uma desparasitação estratégica somente para valores iguais ou superiores a 500 OPG. Para valores inferiores ou iguais a 500 OPG sugerem a ocorrência de uma infeção parasitária leve; entre 800 e 1000 OPG uma infeção moderada e entre 1500 a 2000 OPG uma infeção grave.

8.2. Método de Coprocultura

Seguidamente, realizaram-se coproculturas a todas as amostras, segundo a técnica descrita por Roberts e O’Sullivan (1950), adaptada por Madeira de Carvalho (2001) (Anexo 5), para a correta identificação e contagem das larvas L₃. Esta técnica consiste em criar as condições necessárias para o desenvolvimento dos ovos para L₁, L₂ e L₃ e é a partir da esta última (larva infetante) que é possível identificar e diferenciar géneros e espécies de estrongilídeos através de chaves dicotómicas que realçam algumas características das larvas, como a bainha da larva, posição relativa da célula primordial genital, o número, forma e disposição das células intestinais, entre outras, de acordo com a chave proposta por Madeira de

Carvalho, Fazendeiro e Afonso-Roque (2008) (Anexo 6). As larvas recém-eclodidas apresentam higro e fototropismo positivos, pelo que jogando com estas características, no 14º dia enche-se completamente o copo descartável com água, cobre-se a superfície com uma placa de Petri e inverte-se o conjunto. Deve-se proceder à recolha do líquido 24h depois, permitindo assim oferecer o tempo e condições necessárias para que as larvas migrem para a água na placa de Petri.

Realizou-se a contabilização de larvas em cada 100 µL e identificação. Permitindo a contabilização do número de larvas por grama de fezes (LPG), através da seguinte fórmula

$$(1): \quad LPG = \frac{\sum L_3 \times V}{P}$$

, onde: $\sum L_3$ – somatório de L_3 em 100µL; V – Volume de água total em µL; P – Peso amostras de fezes colocado na coprocultura em grama (g).

Este passo também permite quantificar a capacidade de eclosão das larvas, através do cálculo do rendimento pela seguinte fórmula (2):

$$Rendimento(\%) = \frac{LPG}{OPG} \times 100$$

9. Análise de dados

Para a análise dos dados obtidos, foi utilizada estatística descritiva e indutiva através do programa Excel Microsoft Office v. 2008, permitiu descrever dados quantitativos, como a média, desvio padrão e frequências.

As análises estatísticas também foram efetuadas com recurso ao programa estatístico GenStat (2011). As diferenças entre espécies vegetais em termos de perfil em n-alcanos foram exploradas utilizando a análise de componentes principais (ACP). O efeito da época de estudo na composição da dieta selecionada pelos animais e na condição corporal foi analisado através de uma análise de variância.

As estimativas individuais da composição da dieta foram obtidas utilizando o programa “EatWhat” (Dove & Moore, 1995), que utiliza restrições de não-negatividade das soluções, que minimiza o quadrado dos desvios entre as concentrações dos marcadores nas fezes e as suas concentrações estimadas (diferentes combinações de componentes da dieta). A estimativa da composição da dieta foi baseada nos n-alcanos com cadeia carbonada compreendida entre C_{25} a C_{33} . As concentrações fecais dos marcadores utilizados nos cálculos não foram corrigidas para a sua recuperação fecal incompleta, uma vez que Ferreira *et al* (2007), não observaram em equinos qualquer relação entre o comprimento da cadeia carbonada dos n-alcanos e a sua recuperação fecal.

VI. Resultados

1. Avaliação da vegetação

Na Tabela 7, está representada a avaliação preliminar elaborada antes do início de cada época de observação. Nesta tabela verifica-se a diminuição da altura das plantas da pastagem, entre as duas épocas. Nas zonas 1, 2, 4 e 6 existe uma diminuição da biomassa disponível, enquanto nas zonas 3 e 5 houve um aumento da biomassa.

Tabela 7. Descrição da altura média do pasto (cm) e da biomassa disponível (ton MS/ha) do lameiro segundo as zonas, antes do início de cada época de estudo.

Zonas	Altura média do pasto (cm)		Biomassa (ton MS/ha)	
	junho	julho	junho	julho
Zona 1	>25 - 50	<25	0,195	0,172
Zona 2	>50 – 75	<25	0,251	0,222
Zona 3	<25	<25	0,046	0,067
Zona 4	75	<25	0,077	0,074
Zona 5	<25	<25	0,082	0,132
Zona 6	>25 - 50	<25	0,221	0,156
Média	>43	<25	Σ 0,872	Σ 0,823

Legenda: **Média:** média da altura média do pasto em cada época, junho e julho; **Σ:** Somatório dos valores de biomassa em cada época de estudo.

2. Avaliação da composição química dos alimentos

Na tabela 8, apresentam-se os resultados da composição química da pastagem. Os componentes da parede celular (NDF) representam a maior fração nos dois tipos de alimentos, 625,5 e 613,9 g/kg MS, para herbáceas e arbustivas, respetivamente, durante o mês de junho, apresentando a mesma distribuição no mês de julho, 706,9 e 599,9 g/kg MS. O alimento Arbustivas também revela uma grande proporção de ADF e ADL em ambos os meses, junho e julho (ADF: 455,6 e 429,5 g/kg MS; ADL: 172,4 e 172,9 g/kg MS). Houve diminuição do teor de PB em ambos os alimentos entre as duas épocas de estudo. Os compostos fenólicos e os taninos presentes no alimento Arbustivas também foram medidos em ambas as épocas. Ambos aumentaram da primeira época para a segunda, com os valores em junho de 13,5 e 11,9 g/kg MS, e em julho de 14,6 e 13,1 g/kg MS, para os compostos fenólicos e taninos, respetivamente.

Tabela 8. Composição química (g/kg MS) dos componentes vegetais identificados, Herbáceas e Arbustivas, nas duas épocas de estudo (junho e julho).

Época	C.v.	MO	PB	NDF	ADF	ADL	Hemicelulose	Celulose	Fenólicos totais	Taninos
junho	H	919,2	89,9	625,5	368,1	59,7	257,4	308,4	-	-
	A	930,6	89,7	613,9	455,6	172,4	158,3	283,2	13,5	11,9
julho	H	905,8	77,0	706,9	427,5	72,0	279,4	355,4	-	-
	A	924,3	85,3	599,9	429,5	172,9	170,4	256,6	14,6	13,1

Legenda: C.v. – Componente vegetal; H – herbáceas; A – Arbustiva.

3. Comportamento em pastoreio

Ao longo dos 4 dias de observação comportamental registaram-se 2011 min., com uma média de observação diária de $\mu=942,66\pm23,59$ min./dia, que correspondeu a uma média de $712,97\pm17,68$ min/dia (aprox. 11h53min) dedicados à atividade de pastoreio e uma média de $229,69\pm33$ min/dia (aprox. 3h50) dedicados a outras atividades. Isto equivale a dizer que durante o estudo dedicaram em média 75,64% (1521min.) das atividades para o pastoreio e os restantes 24,36% (490min.) foram dedicados a outras atividades “Negativo” (Tabela 9).

Tabela 9. Dinâmica de ocupação das pastagens, em min. e proporção (%), de acordo com o tempo pastoreado em cada zona ao longo de todo o estudo. Com referência à área (ha) de cada zona do lameiro e sua proporção (%).

Zonas	Área (ha)	Área (%)	Nº minutos	% Nº minutos
Zona 1	0,244	15,33%	439,00	21,83
Zona 2	0,262	16,43%	287,00	14,27
Zona 3	0,170	10,64%	125,00	6,22
Zona 4	0,156	9,78%	107,00	5,32
Zona 5	0,239	14,99%	87,00	4,33
Zona 6	0,523	32,82%	476,00	23,67
Negativo	-	-	490,00	24,36
Total	1,593	100%	2011	75,64%

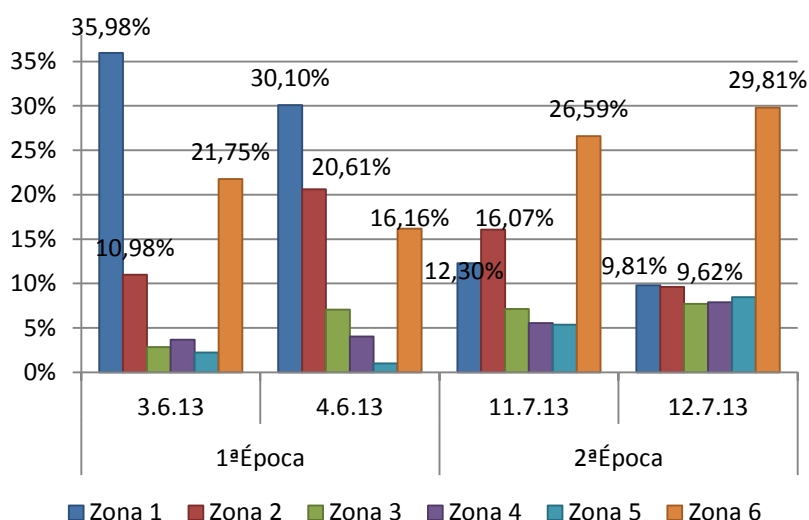
Legenda: Negativo – referência do tempo (min. e %) dispendido pelos animais a outras actividades.

Dentro da categoria “Negativo”, inclui-se atividades como descanso, beber água, limpeza do pelo, espojar, brincar, interação com outras burras, dormir, urinar e defecar. Verificou-se visualmente que atividades como beber água, defecar, urinar e espojar quando aconteciam por parte de um animal, outros seguidamente repetiam essa mesma atividade. Isto acontecia principalmente entre grupos de alguns animais.

Durante os dias de observação comportamental foram averiguados o consumo de folhas e cascas de árvores de plantas como *Fraxinus angustifolia*, *Ulmus minor*, *Prunus* sp., bem como o consumo de *Populus alba* e a total rejeição de plantas como *Lonicera* sp. e *Aristolochia paucinervis*.

A distribuição da proporção do tempo estimado por cada animal pelas distintas zonas segundo o dia de observação (1ª e 2ª época) está representada no Gráfico 1. Verifica-se que na 1ª época de estudo (3 e 4 de junho) houve uma preferência de pastagem diária pela zona 1 (35,98% e 30,10%), seguido da zona 2 (10,98% e 20,61%) ou zona 6 (21,75% e 16,16%) consoante o dia. No dia 3 de junho, nas zonas Z3, Z4 e Z5 dedicaram 2,85%, 3,66%, 2,24% respetivamente. E no dia 4 de junho dedicaram respetivamente, 7,07%, 4,04% e 1,01%.

Gráfico 1. Distribuição do tempo (%) despendido pelo grupo de animais, em cada zona do lameiro nos quatros dias de observação durante as duas épocas de estudo (junho e julho).



No entanto na 2ª época verifica-se a preferência pela permanência na zona 6, havendo praticamente uma uniformização do tempo pelas restantes zonas. Nesta época (11 e 12 de julho), na zona 6 dedicaram respetivamente, 26,59% e 29,81% do dia, à atividade de pastoreio. No dia 11 de julho, a zona 2 (16,07%) sobrepôs à zona 1 (12,30%) e para as restantes zonas, 3, 4 e 5 dedicaram as seguintes proporções diárias: 7,14%, 5,56%, 5,36%. No dia 12 de julho, para as zonas Z1, Z2, Z3, Z4 e Z5, dedicaram as seguintes proporções diárias: 9,81%, 9,62%, 7,69%, 7,88% e 8,46%.

No Anexo 7, está representada a totalidade do tempo gasto pelos animais, segundo a distribuição ao longo do lameiro, refletindo as zonas mais pastoreadas durante todo o estudo. Permite constatar que a zona preferida durante todo o período em estudo (1ª época + 2ª época) foi a 6, seguida das zonas Z1, Z2, Z3, Z4 e Z5.

A distribuição do comportamento em pastoreio ao longo do dia nas duas épocas de estudo, está representada pelos Gráficos 2 (junho) e 3 (julho), revelando a distribuição do número médio de burras que estavam a pastar durante as observações diárias de 15 em 15 min. Verifica-se uma distribuição independente ao longo dos 4 dias de observação em pastoreio, isto é, sem um padrão horário definido.

Gráfico 2. Distribuição do número médio de animais que se apresentavam na actividade de pastoreio na primeira época de observações (3 e 4 de junho).

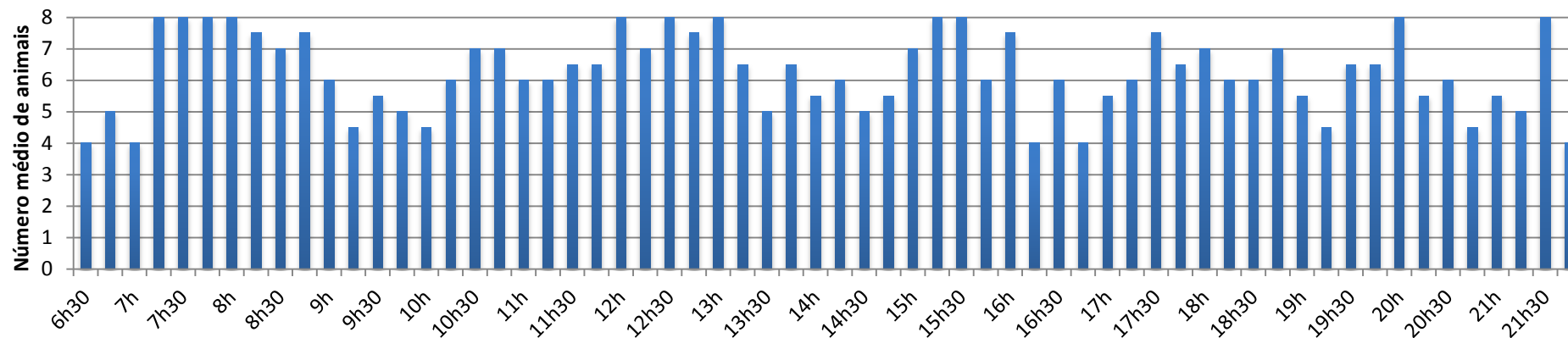
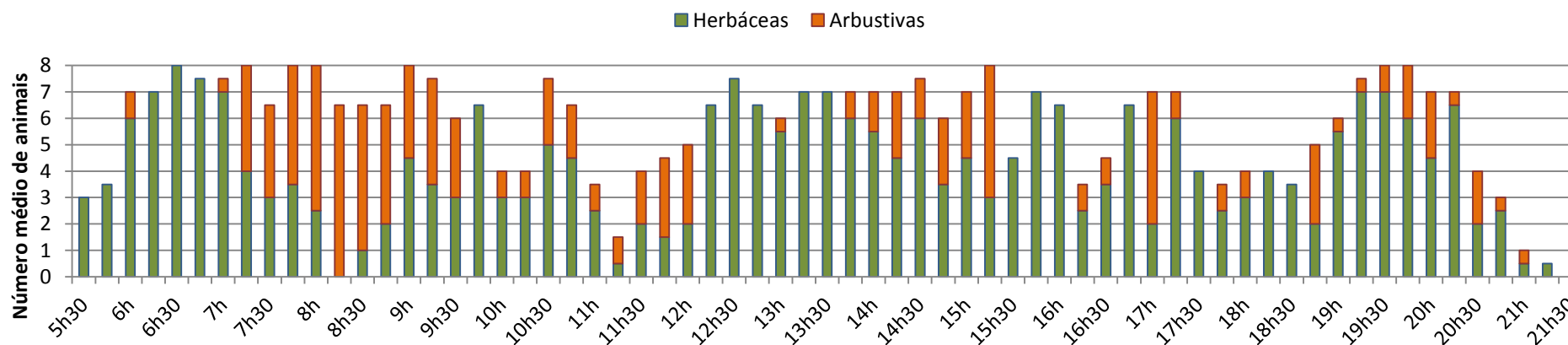
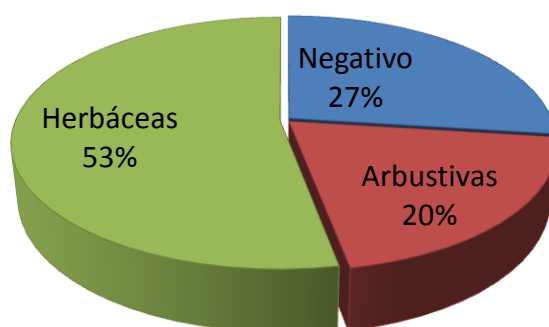


Gráfico 3. Distribuição do número médio de animais que se apresentavam na actividade de pastoreio, ingerindo Herbáceas ou Arbustivas, na segunda época de observações (11 e 12 de julho).



Na segunda época de estudo para além da informação anteriormente descrita, também se recolheram dados sobre o tipo de alimento que os animais escolhiam: pastagem (Herbáceas), ou zona de arbustos e árvores (Arbustivas), pois de acordo com os nossos resultados observados na primeira época, achou-se que seria um dado relevante. No gráfico 4 apresentam-se esses resultados em proporção. Entre os dias 11 e 12 de julho, houve uma média de 53% do tempo dedicado ao pastoreio em Herbáceas, 20% foi dedicado ao pastoreio em Arbustivas e 27% do tempo foi para outras atividades, ou seja em valores absolutos corresponde a 180 min/burra e 204,4 min/burra para os dias 11 e 12 de julho, respetivamente, dedicados ao pastoreio em Arbustivas. O gráfico de distribuição média diária da segunda época (Gráfico 3) revela não apresentar uma relação aparente do pastoreio em Arbustivas com as horas do dia, havendo sim uma maior concentração desse tempo entre as 7h30 e 9h30.

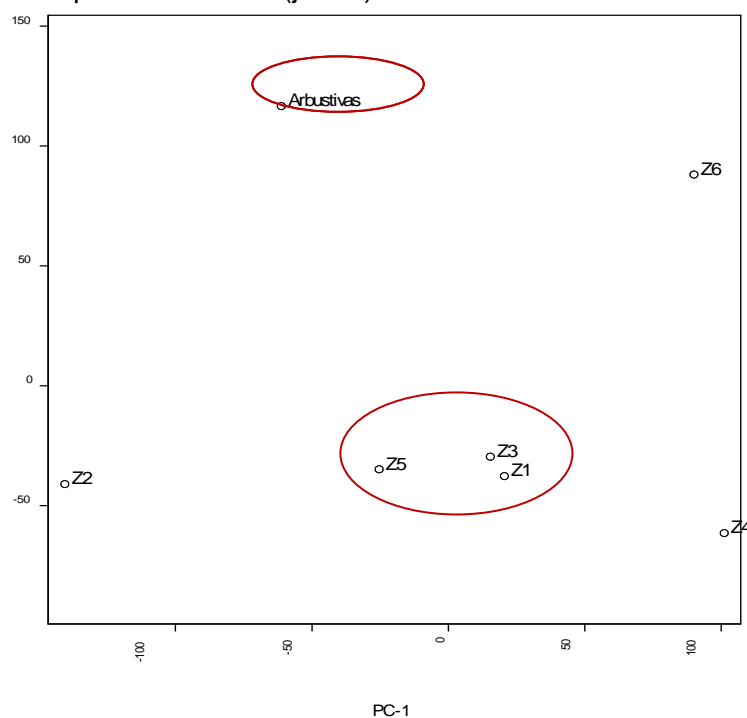
Gráfico 4. Proporção do tempo despendido, relativo ao tipo de alimentação – Herbáceas ou Arbustivas, e ao tempo despendido para outras actividades - Negativo, na segunda época de observações (julho).



4. Composição da dieta

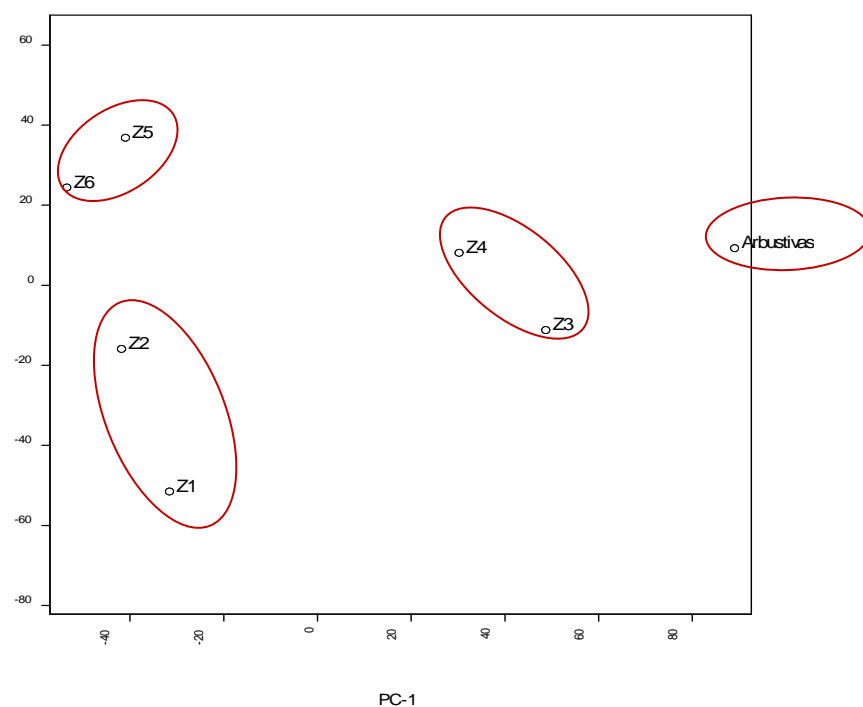
Os gráficos 5 e 6, referem-se à análise dos componentes vegetais, onde a localização distinta de cada alimento é devido à diferente constituição de componentes que as compõem. No gráfico 5, referente ao mês de junho (1ª época), é relevante a diferença entre Arbustivas, Z6, Z4, Z2 e as restantes zonas e no Gráfico 6, referente ao mês de julho (2ª época), destaca-se uma constituição aparentemente distinta das arbustivas em relação às demais zonas, onde Z1 e Z2, Z3 e Z4, e Z5 e Z6, aproximam-se.

Gráfico 5. Análise dos componentes principais das amostras de alimentos, correspondentes à primeira época do estudo (junho).



Legenda: A diferente localização de cada componente vegetal (amostras de alimento), Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 e Arbustivas, refere-se às diferenças de constituição florística que as compõem.

Gráfico 6. Análise dos componentes principais das amostras correspondentes à segunda época do estudo (julho).



Legenda: A diferente localização de cada componente vegetal (amostras de alimento), Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6 e Arbustivas, refere-se às diferenças de constituição florística que as compõem.

O perfil de n-alcanos nos alimentos analisados está representado na Tabela 10. O perfil de n-alcanos dos alimentos fornecidos pelo lameiro revela um predomínio das cadeias ímpares e representa um predomínio com valores iguais ou superiores a 95,0%. O C₂₉ foi predominante no alimento Arbustivas e o C₃₁ foi predominante no alimento Herbáceas. Estes n-alcanos revelam um predomínio $\geq 34,7\%$.

Tabela 10. Concentração dos n-alcanos (mg/kg MS) dos componentes vegetais identificados, Herbáceas e Arbustivas, em cada época de estudo.

Época	Componente vegetal	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	Total	% Impares	% Pred.
junho	Herbáceas	14,097	2,308	31,267	7,257	196,424	9,007	224,747	8,549	57,834	551,490	95,1	40,8
	Arbustiva	19,252	2,564	41,917	7,353	261,634	7,544	128,044	5,482	49,145	522,936	95,6	50,0
julho	Herbáceas	7,983	1,845	21,400	6,908	132,960	6,613	184,024	5,258	55,763	422,754	95,1	43,5
	Arbustiva	10,063	2,118	91,020	8,728	158,204	5,531	106,815	6,618	66,839	455,937	95,0	34,7

Legenda: %Pred.: Proporção do n-alcano predominante.

A distribuição de n-alcanos presentes nas fezes do grupo de animais e a concentração média dos n-alcanos está expressa na Tabela 11. Os n-alcanos ímpares naturais mais representativos na concentração fecal dos burros são o C₂₉, C₃₁ e C₃₃.

Tabela 11. Concentração fecal (mg/kg MS) dos n-alcenos referentes aos animais segundo a época de estudo, junho e julho.

Época	Animal	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33
junho	Algosa	34,843	5,911	74,140	14,295	361,831	16,776	442,022	10,549	94,348
	Belfa	40,493	5,674	80,100	15,210	481,657	17,337	575,542	11,868	124,761
	Bruçó	35,693	5,150	70,158	12,454	360,979	14,221	379,586	10,697	84,490
	Castanha	33,495	6,282	64,737	14,240	407,838	17,115	468,324	14,071	107,410
	Dulcinea	40,364	5,599	81,923	15,442	445,567	16,828	540,940	14,101	120,232
	Ennie	33,025	5,961	63,783	14,403	399,463	15,546	467,441	11,703	115,212
	Especiosa	46,537	7,211	95,054	16,846	572,550	18,409	468,413	13,652	99,336
	Maceda	34,174	5,243	69,573	12,996	485,776	16,545	475,361	13,041	125,558
	Média±SD	37.328± 4.722	5.879± 0.655	74.933± 10.426	14.485± 1.387	439.458± 72.172	16.597± 1.250	477.203± 59.467	12.460± 1.451	108.918± 15.112
julho	Algosa	19,072	6,242	57,116	14,215	407,926	17,231	375,824	12,436	86,726
	Belfa	20,952	6,983	66,451	15,488	441,639	18,985	400,488	15,799	99,025
	Bruçó	16,841	5,637	52,170	12,288	285,757	14,025	301,477	10,423	85,565
	Castanha	18,779	6,140	51,670	13,342	344,263	14,174	343,692	11,818	76,142
	Dulcinea	17,292	5,677	59,023	13,770	358,834	16,252	302,819	11,823	82,196
	Ennie	16,035	5,565	48,678	12,907	378,154	14,217	288,029	9,409	67,757
	Especiosa	18,985	6,006	65,794	14,292	407,325	18,492	410,135	13,845	99,346
	Maceda	18,522	5,878	55,284	13,206	306,354	16,841	386,064	12,696	102,989
	Média±SD	16.585± 5.035	5.363± 1.957	51.416± 17.774	12.211±4. 479	337.009± 117.052	14.328± 5.636	310.242± 111.519	10.876± 4.284	76.484± 26.975

Na tabela 12, apresenta-se a composição da dieta selecionada por cada animal do grupo, relativa à proporção Herbáceas e Arbustivas ao longo das duas épocas de estudo. Na primeira época de estudo houve uma média de seleção de Herbáceas de 65,8% e 34,2% para a espécie Arbustivas. Na segunda época, a percentagem de Herbáceas selecionadas foi de 98%.

Tabela 12. Comparação da dieta selecionada pelos animais em cada época em estudo, junho e julho.

Animal	junho		julho	
	Herbáceas	Arbustivas	Herbáceas	Arbustivas
Algosa	0,638	0,361	1,000	0,000
Belfa	0,725	0,275	1,000	0,000
Bruçó	0,382	0,617	0,925	0,075
Castanha	0,803	0,198	1,000	0,000
Dulcineia	0,589	0,411	1,000	0,000
Ennie	0,846	0,154	1,000	0,000
Especiosa	0,471	0,529	1,000	0,000
Maceda	0,811	0,190	0,918	0,082
Média±SD	0.658±0.169	0.342±0.169	0.980±0.036	0.020±0.036
Efeito	<0.001		<0.001	

5. Condição corporal

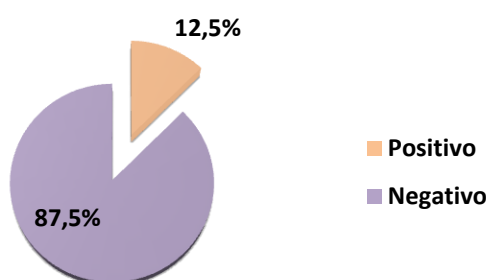
A Tabela 13, indica os resultados relativo à condição corporal (CC) entre as épocas de estudo, junho e julho, e o seu efeito ($p=0,424$). O grupo de animais manteve praticamente a CC desde o início ao fim do estudo, havendo dois animais que desceram meio ponto no fim do trabalho, o que poderá ter influenciado a diminuição da média da CC de 3,2 para 3,1.

Tabela 13. Variação da condição corporal dos animais entre cada época de estudo, junho e julho.

Animal	CC junho	CC julho
Algosa	3,0	3,0
Belfa	3,5	3,5
Bruçó	3,5	3,0
Castanha	3,0	3,0
Dulcineia	3,0	3,0
Ennie	3,0	2,5
Especiosa	3,5	3,5
Maceda	3,0	3,0
Média	3,2	3,1
Efeito	0,424	

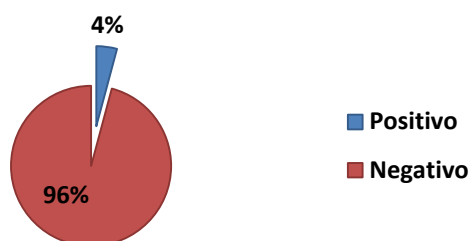
6. Avaliação dos parasitas GI - Estudo de prevalência

Num total de 24 amostras analisadas, apenas em 3 (12,5%) foram observados ovos de tipo estrongilídeo (Gráfico 7). O grupo de animais em estudo revelou no início do estudo 0 OPG, isto é, 100% de asininos negativos (Gráfico 12). A meio do estudo, a prevalência aumentou para um resultado positivo, com o valor de 50 OPG, em 7 amostras negativas (Gráfico 13). No fim do estudo, houve dois resultados positivos (200 OPG e 500 OPG) (Gráficos 14).

Gráfico 7. Taxa de prevalência de OPG.

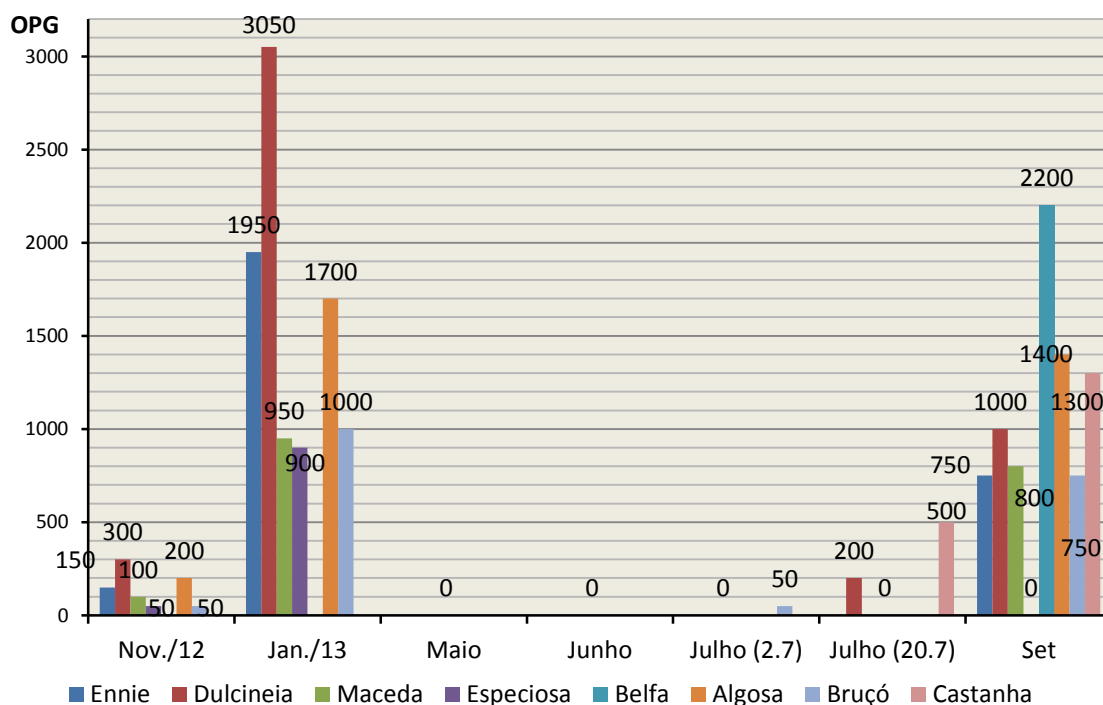
O gráfico 8, representa a frequência e prevalência da taxa de infecção parasitária, em função dos valores de OPG e verifica-se que apenas uma (4%) das três amostras positivas, foi considerada com uma taxa de infecção parasitária fraca (até 500 OPG).

Gráfico 8. Taxa de infecção observada ao longo do estudo.



Em Janeiro (2013) e Setembro (2013), foram os meses onde se registraram maiores eliminações de ovos (> 500 OPG) e onde incidiu a desparasitação (Gráfico 9). Está representada a evolução da variação da carga parasitária de cada animal do grupo, onde podemos constatar que o nosso estudo coincidiu durante a época em que estes não apresentavam carga parasitária significativa.

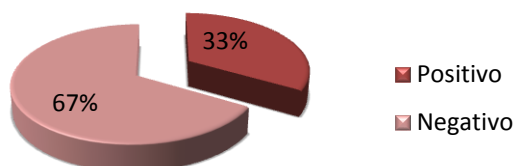
Gráfico 9. Evolução da variação da carga parasitária (OPG) de cada animal presente no estudo, desde Novembro de 2012 a Setembro de 2013 (Dados complementares à data do estudo cedidos pelo Dr. Sérgio Sousa).



7. Avaliação da biodiversidade parasitária

Após a realização da coprocultura procedeu-se à identificação e contagem das larvas infetantes, revelando uma presença de 100% de nematodes da subfamília Cyathostominae, em 33% (n=8) das amostras positivas de 24 amostras num total (Gráfico 10).

Gráfico 10. Frequência relativa das amostras positivas à coprocultura.



Em cada tubo das coproculturas, foi realizada uma diluição de 1mL, onde foram contabilizadas todas as L₃ e posterior identificação até contabilizar 100 larvas. No entanto, nem sempre foi possível contabilizar as 100 larvas devido à baixa carga helmíntica (n=5). Quanto à identificação de larvas L₃ os resultados foram 100% unânimes para o género *Cyathostomum sensu latum*. Dentro de este género (Gráfico 11), que se pode subdividir em 8 morfotipos larvares, onde o morfotipo A foi o mais prevalente, seguido do tipo C. O morfotipo A foi observado na totalidade das amostras positivas, com uma frequência de 83,33%, os morfotipos B, C, D, F e G também foram observados, em 2,98%, 8,04%, 3,87%, 1,19% e 0,60% respetivamente (Figura 3 e 4.).

Gráfico 11. Abundância proporcional média (%) dos diferentes morfotipos de *Cyathostomum sensu latum* observados.

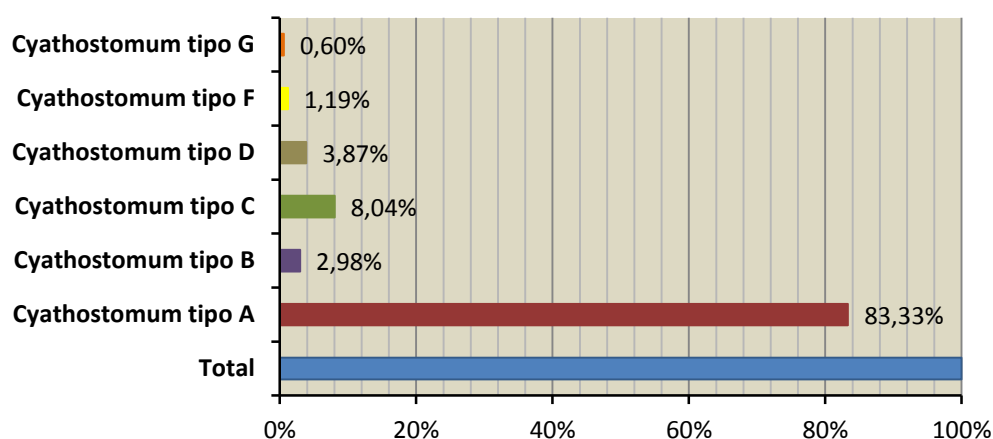
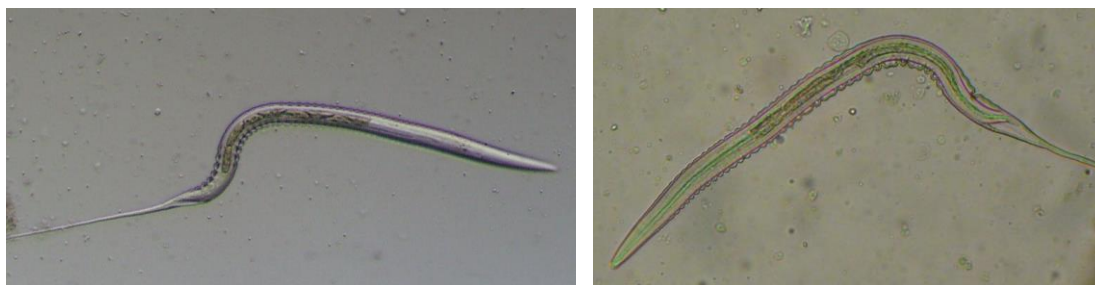


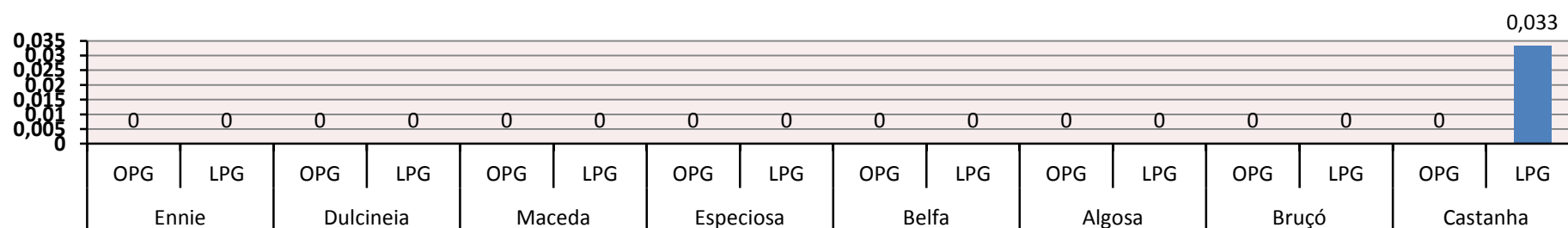
Figura 4 e 5. Ciatostomíneo do tipo A (à esquerda, ampliação aproximadamente 100x) e Ciatostomíneo do tipo C (à direita, ampliação aproximadamente 250x), exemplares encontrados nas coproculturas realizadas (Fotografia original).



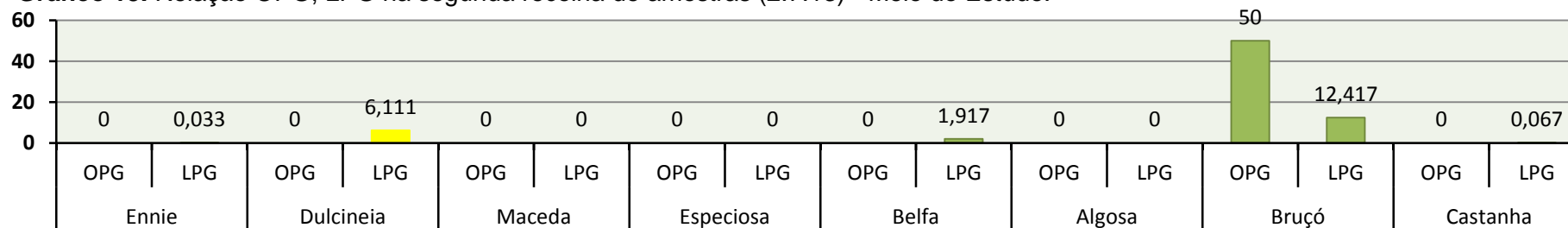
8. Análise da variação do grau de parasitismo por estrongilídeos através do OPG e LPG em cultura

Os gráficos 12, 13 e 14, demonstram a relação de OPG e LPG ao longo do estudo e respectiva média e desvio-padrão (SD), tendo atenção à escala do eixo dos YY, pois varia consoante as cargas parasitárias encontradas. Dos resultados positivos à técnica de McMaster (n=3), somente dois foram positivos à coprologia.

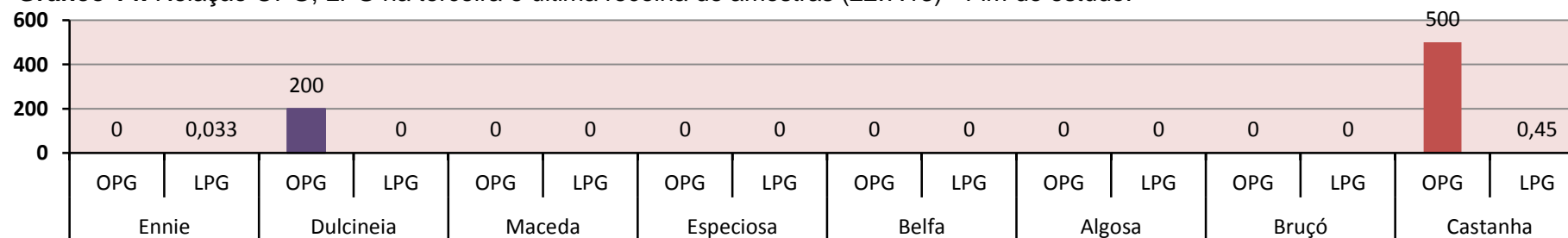
Através dos dados obtidos relativo à média de OPG (Legenda dos Gráficos 12, 13 e 14), verifica-se um aumento progressivo da eliminação de ovos de estrongilídeos ao longo do período de estudo. No início do estudo, em junho, constatamos uma média de 0, subindo para uma média de 6,25 OPG por burra, terminando em julho com uma média de 87,5 OPG/burra. Os valores discrepantes dos SD, refletem o grande número de amostras com resultado negativo. Relativamente aos resultados das médias de LPG, a média de L₃/g de fezes foi de 0; 2,57 e 0,06 no início, meio e fim do estudo, respetivamente. A meio do estudo (22/6/13) foi quando apresentaram uma maior média de LPG.

Gráfico 12. Relação de OPG,LPG na primeira recolha de amostras (2.6.13) - Início do estudo.

Legenda: $\mu_{\text{início}}=0\pm0$ OPG; $\mu_{\text{início}}=0\pm0$ LPG

Gráfico 13. Relação OPG, LPG na segunda recolha de amostras (2.7.13) - Meio do Estudo.

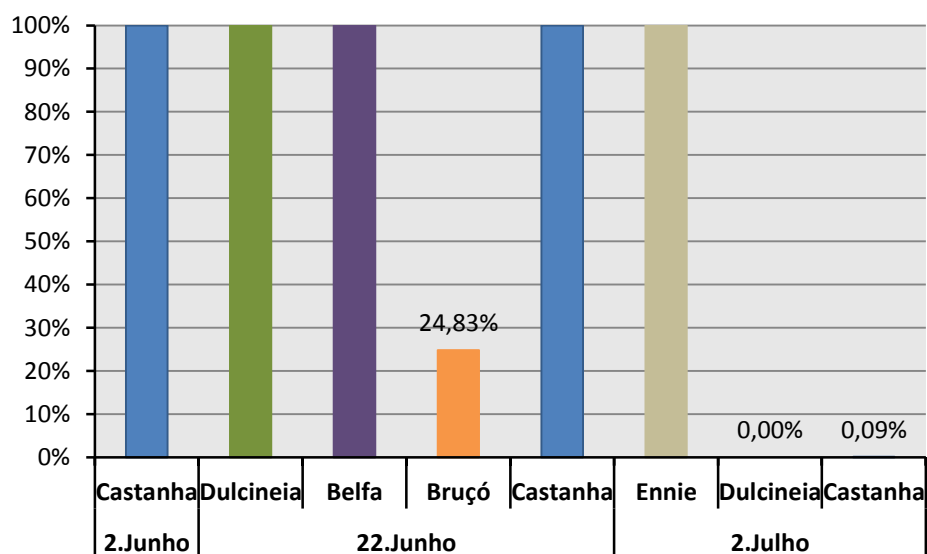
Legenda: $\mu_{\text{meio}}=6,25 \pm 17,68$ OPG; $\mu_{\text{meio}}=2,57 \pm 4,51$ LPG.

Gráfico 14. Relação OPG, LPG na terceira e última recolha de amostras (22.7.13) - Fim do estudo.

Legenda: $\mu_{\text{fim}}=87,5 \pm 180,78$ OPG; $\mu_{\text{fim}}=0,06 \pm 0,17$ LPG

Relativamente ao rendimento, somente foi possível contabilizar aquelas nas quais o divisor e dividendo não foram negativos ($= 0$), ou seja as que foram positivas à contabilização de OPG ou LPG. Ao quantificar os valores de LPG, primeiramente será de esperar que os valores de LPG acompanhem os valores de OPG. No entanto, em 5 casos houve eclosão de larvas, com valores de OPG negativos ($= 0$). Nestes casos o rendimento é de 100%. Obtendo também três resultados, com os valores: 24.8% (no meio do estudo), 0% e 0,09%, ambos no fim do estudo (Gráfico 15).

Gráfico 15. Rendimento calculado a partir dos resultados de OPG e LPG.



VII. Discussão

1. Análise da vegetação

Segundo Poças *et al* (2006), a utilização das pastagens como alimento para os animais de produção, é uma maneira de controlar o desenvolvimento de várias espécies vegetais. Desse modo torna-se fundamental compreender o papel do animal nas pastagens, particularmente o seu comportamento alimentar, para uma melhor gestão das pastagens seminaturais. Moreira *et al* (2001), referem que a altura ideal da erva em pastoreio livre é de 10 cm e 20-25cm em pastoreio rotacional, para a espécie bovina. Na primeira época do nosso estudo, a altura da pastagem apresentava uma altura média de 43 cm, e na segunda época com o pastoreio contínuo e pisoteio, a altura foi sempre inferior a 25 cm, o que poderia levar a inferir que na segunda época foi quando houve um aproveitamento mais eficiente do lameiro. Por outro lado, estes dados sendo referentes a uma espécie animal diferente, não nos permitem comparar totalmente os dois períodos de observação, pois sabe-se que o comportamento alimentar asinino apresenta diferenças com outras espécies herbívoras, e eventualmente o seu impacto ambiental será distinto (Tabela 7).

No entanto, se tivermos em conta o comportamento dos asininos, e o seu caráter exploratório, poderá ter havido um efeito de pisoteio no início do primeiro período de estudo, dada a elevada altura da erva. A diferença do tamanho e a proximidade dos valores de biomassa sugerem que a diferença entre a 1ª e a 2ª época foi a humidade presente nas plantas, ou seja houve perda de humidade da pastagem, de uma época para a outra.

2. Análise da composição química da dieta

Quanto à composição química e valor alimentar, Moreira *et al* (2001), referem que o valor da PB dos lameiros de montanha varia anualmente entre 8 e 20%, consoante a riqueza da pastagem. No nosso estudo, o valor da PB variou entre 7,7 e 8,9 % (Tabela 8). De notar que o nosso estudo foi conduzido no final do ciclo vegetativo das plantas, podendo justificar os valores de PB encontrados quando comparados com os de Moreira *et al* (2001). Também a elevada variabilidade florística encontrada em diferentes lameiros de montanha deve ser tida em conta.

Ao analisar a composição química dos componentes vegetais, é de realçar a diminuição dos valores de MO e PB, e o aumento dos valores de NDF, ADF, ADL e celulose, para as Herbáceas segundo a época de estudo, indicando que a pastagem teria maior valor nutritivo em junho do que em julho, o que está de acordo com o avançar do ciclo vegetativo das cultivares presentes no lameiro. Em relação às Arbustivas, houve uma ligeira diminuição de todos os compostos analisados, destacando a grande proporção de NDF e ADF (fibra) que apresentam na sua constituição. Relativamente aos compostos fenólicos, são compostos

secundários, associados aos seus efeitos anti nutricionais (Barry, McNeill & McNabb, 2001). Estes valores foram recolhidos devido aos estudos que se tem feito, principalmente em ruminantes, sobre a relação da ingestão deste tipo de compostos e a acção desparasitante (Coop & Kyriazakis, 2001; Min & Hart, 2003; Osoro *et al*, 2006; Frutos *et al*, 2009; Lisonbee *et al*, 2009). Ao observar os valores registados por nós, podemos afirmar que a grande maioria dos compostos fenólicos nas nossas amostras de arbustivas eram taninos. Os taninos, podem ser hidrolizáveis, estando estes associados a efeitos praticamente nefastos, sendo o exemplo a espécie *Quercus ilex* (Camp *et al*, 1967 citado por Min & Hart, 2003); ou taninos condensados (CT), que fazem parte da classe de compostos fenólicos polimerizados (Barry *et al*, 2001; Lisonbee *et al*, 2009). Sendo relevante destacar a alta proporção de CT em relação à totalidade de compostos fenólicos presentes no alimento Arbustivas, e que podem ter sido integrantes na dieta dos animais. Recolheu-se apenas os dados do alimento Arbustivas, pelo facto de ser neste tipo de plantas onde está relatado a sua maior proporção (Barry & McNabb, 1999).

3. Análise do comportamento em pastoreio

Neste estudo realizaram-se duas épocas de observação do comportamento em pastoreio, desde o nascer do sol ao pôr-do-sol. Como a duração do período de observação (ou seja, os min. observados por dia) variou entre as épocas de estudo, foi necessário expressar o tempo de pastoreio, em termos de percentagem dos minutos observados por dia.

Ao longo dos 4 dias, houve uma média de $712,97 \pm 23,59$ min./dia (aprox. 11h53min) dedicados à atividade de pastoreio, o que corresponde a cerca de 75,64% e o restante (24,36%) para outras atividades (Tabela 9). O estudo foi realizado no verão, compreendendo o mês de junho e julho. Segundo Smith (1999), e Smith e Pearson (2005), os burros em condições selvagens podem chegar a dispender 14 a 18h (58,3-75%) diárias para o pastoreio, enquanto Aganga e Tsopito (1998), relataram que podem chegar a 85% do tempo. Conacoo e Avornyo (1998), num estudo no Gana onde os burros eram abrigados pela noite, o tempo médio de pastoreio foi de 84% com uma pastagem de baixo valor nutritivo. Por outro lado, Lamoot *et al* (2005), constatarem resultados inferiores aos obtidos por nós num estudo realizado numa zona costeira de clima temperado. O grupo de animais pastoreou cerca de 45% durante o Verão e na Primavera registaram até cerca de 64% do tempo dedicado ao pastoreio, sendo esta variação justificada pela variação sazonal da forragem. Duncan (1985), citado por Lamoot *et al* (2005), considera que o burro, à semelhança dos demais equídeos apresenta um pastoreio fundamentalmente diurno. O nosso grupo de animais esteve submetido a um pastoreio condicionado com confinamento noturno. Martin-Rosset e Doreau (1984), citado por Ferreira *et al* (2013), referem que o pastoreio noturno de equinos selvagens pode representar cerca de 20-50% do tempo total,

dependendo das condições climáticas, e Dittrich, Melo, Afonso e Dittrich (2010), referem que o condicionamento pode alterar os padrões em pastoreio, diminuindo o tempo de alimentação, aumentando o tempo de lazer e poderá aumentar a probabilidade de desenvolvimento de estereotípias. Entre a primeira e a segunda época de observações, houve uma diminuição do tempo de pastoreio. Lamoot *et al* (2005), verificaram uma tendência para a diminuição do tempo de pastoreio no seu estudo, justificando a possível associação do aumento de relações interativas e do conhecimento do local com uma maior eficácia de pastoreio, o que pode ter acontecido no nosso estudo.

Além da disponibilidade de alimentos, as condições climáticas também são capazes de modificar o comportamento de pastoreio. Ferreira *et al* (2013), num estudo em éguas em pastoreio livre no norte da Península Ibérica, constataram um padrão de distribuição do pastoreio diário segundo as horas de calor, ou seja o pastoreio ficou concentrado no início e no fim do dia, dado este também reportado por French (1999). Este caso não foi reportado no nosso estudo, visto que os animais apresentaram uma distribuição desigual de pastoreio ao longo do dia (Gráficos 2 e 3). O facto de o lameiro apresentar zonas arbustivas e arborizadas com sombra, provavelmente permitiu o pastoreio nas horas de maior calor tal como foi observado no nosso estudo.

O burro, como todos os herbívoros em condições de pastoreio livre, tem de tomar decisões por instinto, de diferentes níveis, de modo a formar uma estratégia que supra as necessidades nutritivas. Para isso, a utilização do habitat é o reflexo de como os animais resolvem as suas necessidades alimentares e as suas limitações intrínsecas e extrínsecas (Illius & Gordon, 1993 citado por Lamoot *et al*, 2005). O uso do habitat implica decisões para os animais, dependentes da disponibilidade e qualidade do alimento, que invariavelmente varia segundo as condições climáticas (Lamoot *et al*, 2005). Relativamente à ocupação do lameiro, o comportamento asinino variou segundo as épocas de estudo, na primeira época houve uma maior permanência pelas Zonas 1 e Z2, sendo estas zonas mais próximas da zona de entrada do lameiro, enquanto na segunda época de observações constatou-se uma maior permanência na zona 6 (Gráfico 1 e Tabela 9). Em parte este comportamento pode ser tanto pela disponibilidade alimentar (maior na zona 6), bem como por um tipo de pastoreio mais eficiente e pelo facto dos animais já conhecerem a área de pastagem como referido anteriormente.

Paralelamente observou-se desde o início do estudo o consumo por parte dos animais de casca de árvores, o que segundo Aganga e Tsopito (1998), poderia estar associado a pouca disponibilidade alimentar, no entanto, na nossa opinião, na primeira época do estudo, este consumo poderá ter estado associado à maior necessidade de fibra na dieta (Izraely, Choshniak, Stevens, Demment & Shkolnik, 1989; Mueller *et al*, 1998; Cosyns *et al*, 2001; Pearson *et al*, 2001; Lamoot *et al*, 2005; Burden, 2011). Wood, Smith, Morris e Cuddeford (2012), observaram que houve um consumo de plantas lenhosas mesmo quando os animais

tinham pastagem disponível com bom valor nutritivo, o que também se verificou neste estudo. Na segunda época, com a diminuição da disponibilidade de alimento, a partir de observações visuais, constatou-se o mesmo que Conacoo e Avornyo (1998), e Suss e Schwabe (2007), isto é, a capacidade de desenterrar raízes como alimento. Cosyns *et al* (2001), e Lamoot *et al* (2005), referem a escolha de plantas da espécie *Fraxinus angustifolia*, sendo uma árvore que foi visualmente observada e identificada neste estudo, com o consumo de folhas e cascas de árvores. Lamoot *et al* (2005), referem também o consumo de espécies como *Populus alba* (presente apenas na zona 4), *Ulmus minor*, *Prunus* sp, *Lolium vulgar*, plantas que foram identificadas no lameiro e principalmente as espécies arbustivas foram visualmente observadas o seu consumo. Por outra parte, plantas identificadas no lameiro, comumente conhecidas como, Madressilva (*Lonicera* sp.) e Erva-bicha (*Aristolochia paucinervis*), não foram consumidas durante o estudo, isto é, houve uma total rejeição do consumo desta plantas por parte dos animais, observando a sua presença integral no fim do estudo.

4. Análise da composição da dieta

A composição da dieta foi estimada pela relação entre o teor de n-alcanos nas fezes e o conteúdo de n-alcanos nas plantas disponíveis na dieta dos herbívoros (Dove & Moore, 1995). Relativamente à recuperação fecal de n-alcanos Vouzela (2002) reportou um comportamento distinto, verificando a diminuição das concentrações de n-alcanos recuperados com o aumento da cadeia de carbonos. No entanto, neste estudo não se realizaram correções fecais, pois Ferreira *et al* (2007), em animais não ruminantes, como é o caso dos equídeos, referiram que as recuperações dos marcadores não foram afetadas pelo comprimento da cadeia de carbono. Segundo os gráficos 5 e 6, inicialmente trataram-se todas as amostras de forma individual (por zonas), no entanto, houve a necessidade de agrupar os vários tipos de alimentos de cada zona, visto que o lameiro é uma fonte de biodiversidade, as plantas identificadas podem representar apenas uma pequena parte do que realmente existe e apresentavam uma distribuição consideravelmente uniforme pelo lameiro isto é, não havia nenhuma zona onde houvesse um predomínio claro de alguma espécie de planta. Por isso, após efetuar uma análise de componentes principais, optou-se por agrupar as plantas em dois grupos: Arbustivas e Herbáceas (somatório das amostras recolhidas em cada zona: Z1+Z2+Z3+Z4+Z5+Z6, onde revelava um predomínio de gramíneas), tratando-as assim como um único componente vegetal para uma melhor compreensão das escolhas realizadas pelo grupo de animais. Assim no gráfico 5 (1ª época), em relação ao alimento Herbáceas, o Z6 apresentou um perfil em n-alcanos diferente das restantes zonas (Z1, Z2, Z3, Z4 e Z5), no entanto, a composição química semelhante permitiu agrupar todas as zonas (Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 e Z6), além disso todas elas

apresentavam perfis em n-alcanos semelhantes. No gráfico 6 (2ª época), do ponto de vista de n-alcanos os perfis foram distintos, mas uma vez mais a semelhante composição química permitiu agregá-las. Por outro lado, este tipo de agrupamento foi uma forma de ultrapassar uma das limitações da técnica de n-alcanos que, segundo Dove e Mayes (2006), o número máximo de espécies que podem ser separadas depende do número de n-alcanos usados para a estimativa, ou seja o número de componentes da dieta (espécies de plantas, partes de plantas ou ambas) que podem ser discriminados está limitado a 9. Para além disso o aumento do número de componentes da dieta, provavelmente comprometem a precisão da estimativa da composição da dieta porque há um aumento da probabilidade de conjugação de diferentes combinações de dois ou mais componentes com padrões de n-alcanos semelhantes, e padrões de n-alcanos semelhantes reduzem a capacidade de discriminar espécies de plantas (Ferreira, Celaya, García, Rodrigues & Osoro, 2009). Recorrer ao agrupamento de espécies de plantas com perfis de n-alcanos indistinguíveis ou eliminação de espécies de plantas com base em informações preliminares pode ser um método para superar esta limitação, que consiste no aumento do poder discriminatório entre espécies de plantas que combinem os n-alcanos com outros marcadores (Ferreira *et al*, 2009). O agrupamento deve ser avaliado com minuciosidade, pois pode vir a alterar a proporção das espécies na dieta e o seu contributo para o conteúdo de n-alcanos nas fezes (Bugalho *et al*, 2002). A falta de uma medida absoluta da composição da dieta em animais de pastoreio, permite a validação do uso de n-alcanos como técnica (Dove & Mayes, 1996). O perfil de n-alcanos dos alimentos utilizados, Herbáceas e Arbustivas (Tabela 10), é semelhante ao que foi reportado por Vouzela (2002), Dove e Mayes (2005), e Ferreira, Oliván, Rodrigues, García e Osoro (2005) ou seja, o predomínio das cadeias ímpares com proporções iguais ou superiores a 95.0%, concordando com a bibliografia que refere uma das suas características, é o predomínio das cadeias ímpares com proporções superiores a 90% (Dove & Mayes, 1991; Dove & Mayes, 1996). Segundo Dove e Mayes (1996), e Vouzela (2002), este último concretamente num estudo com burros, os n-alcanos predominantes são C₂₉, C₃₁ e C₃₃, o que vai ao encontro dos resultados obtidos, sendo o C₂₉ predominante para as Arbustivas e o C₃₁ para as Herbáceas, e o C₃₃ o menos predominante em relação a estes dois. Os n-alcanos C₂₁-C₂₄ não foram utilizados, pois segundo Dove e Mayes (2006), para concentrações de n-alcanos muito baixas, como foi o caso, os erros de medições podem tornar-se excessivos.

É de notar, a descida das concentrações dos n-alcanos entre as épocas de colheitas de amostras, de junho para julho, o que também foi reportado por Dove, Mayes e Freer (1996), e Fukomoto *et al* (2007), que constatarem a diminuição das concentrações de n-alcanos com a idade e maturação das plantas, bem como diferenças entre as diferentes partes de plantas.

A nível individual, é relevante as diferenças de recuperações fecais diárias entre as

concentrações de n-alcanos naturais presentes nas fezes, diferença esta que foi mais marcada entre cada época de estudo (Tabela 11), o que pode ser devido às diferenças de hábitos alimentares, à composição da dieta diária distinta e à disponibilidade de alimentos, que indiretamente vão influenciar o volume da digesta no sistema digestivo e a velocidade de passagem dos alimentos (Vouzela, 2002).

Os herbívoros em pastoreio livre têm a oportunidade de alterar a composição da sua dieta, selecionando espécies e partes de plantas presentes na pastagem durante o pastoreio, de modo a formar uma estratégia que supra as necessidades nutritivas (Lamoot *et al* 2005). Relativamente à dieta selecionada pelo grupo de animais (Tabela 12), no mês de junho os resultados obtidos revelaram o consumo de 65,8% de Herbáceas e 34,2% de Arbustivas ($p < 0,001$). Na segunda época, esta proporção modificou-se, para 98% da dieta constituída por Herbáceas e os restantes 2% para Arbustivas ($p < 0,001$). Nesta época de estudo, também é de notar que a constituição da dieta de 2% para as Arbustivas foram representadas por apenas dois animais. A primeira época de estudo realizou-se sob o pressuposto de maior quantidade de alimento disponível – 0,872 ton MS /ha – relativamente à segunda época de estudo – 0,823 ton MS/ha, no entanto o curto período de estudo não permitiu a presença de novos exemplares florísticos, mas sim de novos hábitos alimentares.

Em relação à composição da dieta existem diversos estudos, com finalidades distintas, sendo maioritariamente com o objetivo de compreender o impacto ecológico na utilização destes animais. Vários autores (Rutagwenda *et al*, 1990; Cosyns *et al*, 2001; Lamoot *et al*, 2005; Wood *et al*, 2012) referem a preferência alimentar dos asininos pelas gramíneas tal como acontece nos equinos (Dittrich *et al*, 2010; García *et al*, 2013). Rutagwenda *et al* (1990), numa zona semiárida arbustiva constataram que os burros passaram cerca de 60-90% do tempo de pastoreio a comer plantas monocotiledóneas (as gramíneas de uma maneira geral incluem-se neste grupo), o restante tempo a comer dicotiledóneas o que revelou um maior consumo destas últimas na estação seca (até 70%). É de notar que geralmente as monocotiledóneas sofrem uma drástica mudança de valor nutritivo em comparação com as dicotiledóneas (Van Soest, 1982). Cosyns *et al* (2001), num estudo nas dunas da Bélgica durante o Verão e o Outono, verificaram que 69% da dieta dos burros era constituída por gramíneas, sendo o restante ocupado principalmente por espécie de plantas lenhosas. Adicionalmente, através de resultados observacionais, estimaram o consumo de cerca de 111 espécies de plantas. Lamoot *et al* (2005), também reportaram a preferência por habitat, neste caso, ambientes forrageiros em todas as estações, e a exploração de zonas arbustivas e florestais foi variável ao longo do tempo. E segundo estes autores, a dieta foi composta maioritariamente por gramíneas (80%), seguida de arbustos herbáceos e plantas lenhosas. A preferência por plantas lenhosas não foi observada nos cavalos Konik, selecionando apenas herbáceas (Cosyns *et al*, 2001). Num outro estudo efetuado por Woodward e Ohmart (1976), a dieta dos burros nas montanhas de Chemehuevi na

Califórnia, compreendeu cerca de 39 espécies de plantas, com uma proporção de 3.9% de gramíneas, 30.1% de arbustivas, 61.1% em brotos tenros e 4.9% em plantas cuja identificação não foi possível. Estes resultados, sugerem que o consumo de plantas lenhosas é normal pela espécie asinina e são integrantes na dieta destes animais em sistemas de pastoreio livre. As observações visuais no início do estudo, permitiram confirmar a preferência por gramíneas, pois através de observação visual constatou-se que numa primeira abordagem ao lameiro, os animais comeram as inflorescências das gramíneas. E segundo Cosyns *et al* (2001), Lamoot *et al* (2005), e Wood *et al* (2012), é de considerar o efeito da sazonalidade para estas opções diferenciais da constituição da dieta.

5. Condição corporal

É do interesse médico-veterinário e dos proprietários a monitorização da condição corporal dos seus animais. A condição corporal é vulgarmente utilizada como um indicador do estado nutricional e bem-estar animal, neste caso do burro, e é um conceito bastante utilizado particularmente em animais (Pearson & Mohammed, 2000; Wood, 2010). Perante a falta de estudos sobre as necessidades nutricionais exatas dos burros, a medição rotineira da condição corporal pode ajudar no ajuste das dietas utilizadas, principalmente nas épocas de maior abundância de pastagens, e no inverno onde há escassez da pastagem e é quando o animal utiliza as suas reservas corporais (reservas lipídicas) para a manutenção da temperatura corporal (Smith & Wood, 2008). Atualmente existem dois métodos de avaliação da condição corporal, um desenvolvido pelo *Donkey Sanctuary* (Smith & Wood, 2008) e outra por Pearson e Mohammed (2000). Smith e Wood (2008), referem que devido à elevada subjetividade do método, a precisão da predição exige ser elevada para fornecer estimativas mais exatas, e para isso sugerem o uso de uma única escala e repetibilidade do método para uniformizar a classificação. É essencial conhecer bem a forma natural do burro (angular e abdómen pendular), reconhecer os locais comuns de acumulação de gordura que frequentemente têm distribuição desigual (pescoço, zona da espádua, ao longo do dorso e costelas, flanco e rabada), e através da palpação conseguir sentir as estruturas anatómicas de referência (Smith & Wood, 2008). O método *Donkey Sanctuary* utiliza uma escala de 1-5 pontos. Inicialmente podemos classificar o burro em três classes: magro, médio ou gordo, e posteriormente prosseguir à classificação mais precisa segundo a escala sugerida pela *Donkey Sanctuary* (Smith & Wood, 2008). No nosso estudo utilizou-se a escala proposta por Smith e Wood (2008) e sobre esta iremos abordar a discussão. Durante o nosso estudo (Tabela 13), o grupo de animais encontrou-se nos valores para os quais se consideram ideais (CC entre 2,5-3), com o qual aparentemente o estudo realizado não interferiu (Pearson & Mohammed, 2000; Wood, 2010). Os burros parecem ser capazes de manter uma melhor condição corporal que muitas espécies pecuárias durante a estação seca, quando há maior escassez de alimento. Isto pode ser devido ao facto de apresentarem

exigências metabólicas diminuídas, maior selectividade para partes de plantas altamente nutritivas, maior tolerância a alimentos indesejáveis, aumento do consumo e passagem de alimentos fibrosos (Muller *et al*, 1998). Estudos evidenciam que os burros conseguem reter o alimento por mais tempo no aparelho digestivo. Desta forma há uma digestão mais eficiente da fibra, comparativamente com outros equídeos, e apresentam também uma maior digestibilidade de MS, Energia, PB e da fração fibrosa (NDF) (Pearson *et al*, 2001). Estas diferenças de necessidades e capacidades digestivas podem levar a diferenças comportamentais em regime de pastoreio livre (Pearson *et al*, 2001). Wood *et al* (2005) e Wood (2010), constataram que existem de facto menores necessidades energéticas por parte dos burros. Alguns estudos realizados com alimentação fibrosa, palha *ad libitum* (Carretero-Roque, Colunga, Smith, Gonzalez & Solis-Mendez, 2005), e feno (Wood *et al*, 2005) sugerem um consumo voluntário de 1,3-1,7% MS/dia PV, consoante a estação do ano, e para estes valores os autores consideram que as necessidades energéticas estão satisfeitas, o que permite ponderar que as necessidades proteicas também são satisfeitas (Wood & Smith, 2008). Relativamente à energia de manutenção, os resultados apontam para valores entre 80-95 ED kJ/kg PV/dia, sendo o valor máximo para estação fria. Estes valores apresentam-se ligeiramente inferiores com os valores observados para o pônei (140 ED kJ/kg) (Smith & Wood, 2008; Burden, 2011).

O valor proteico da maioria das pastagens é suficiente para suprir as necessidades nutricionais dos equinos adultos em diversos estados fisiológicos, o que permite adoptar sistemas de pastoreio adequados e oferecer uma utilização mais eficiente e sustentável (Hughes & Gallagher, 1993 citado por Dittrich *et al*, 2010). Segundo Izraely *et al* (1989), os burros conseguiram manter a condição corporal com uma alimentação à base de palha de trigo que continha apenas 3 % de PB. No entanto, no estudo de Pearson e Merrit (1991), uma alimentação *ad libitum* à base de palha de cevada e feno não foi suficiente para atingir todas as necessidades nutricionais (nível proteico semelhante). No estudo realizado por Mueller *et al* (1998), com uma dieta *ad libitum* avaliada em 6,5% PB, sugerem que foi suficiente para suprir as necessidades nutritivas. Segundo Wood *et al* (2005), as directrizes actuais para alimentar os equinos não são adequadas para o cálculo dos requisitos nutricionais de burros, e a eventual eficiência digestiva superior destes animais já foi sugerida por alguns autores (Wood, 2010). Perante os nossos resultados e a bibliografia existente, o nível de proteína disponível foi suficiente para suprir as necessidades dos asininos em estudo.

6. Parasitas GI

Antes de partir para a discussão dos resultados propriamente ditos, devemos ter em conta a metodologia efetuada, desde a colheita das amostras fecais, conservação, envio para o

laboratório e processamento laboratorial. Estes são fatores inerentes para um correto exame coprológico (Sousa, 2009). A metodologia aplicada neste trabalho, segue a diretrizes de outros autores (Thienpont *et al*, 1986; Kassai, 1999; Madeira de Carvalho, 2001).

A contagem de ovos pelo método McMaster, técnica quantitativa, permite o diagnóstico de parasitismo determinando o nível de infecção/eliminação de ovos (Soulsby, 1986). No entanto, também é importante referir as suas limitações, como a possibilidade de falsos negativos, devido a uma distribuição não homogênea da amostra fecal, avaliação apenas de uma pequena subamostra (2g) e por apenas permitir determinar valores iguais ou superiores a 50 OPG o que diminui a sensibilidade da técnica (Kassai, 1999; Foreyt & Foreyt, 2001). Segundo Thienpont *et al* (1986), a contagem de ovos por diluição perde a fiabilidade quando são infecções com baixa carga parasitária. A contagem de ovos nas fezes a partir do método de McMaster poderá não ser representativo do grau de infecção pois, também é influenciada pelo total de fezes emitidas por dia, bem como pela consistência das fezes, o que segundo Wells *et al* (1998), consideram que as contagens elevadas de ovos frequentemente encontradas em asininos devem-se ao facto das fezes dos asininos serem normalmente mais secas e por isso encontram-se mais concentradas. A produção de ovos também é um fator inerente aquando se utiliza este tipo de metodologias, o que varia segundo o tipo de parasita em causa (existência unicamente de parasitas fêmeas ou machos, períodos de hipobiose e fases de desenvolvimento pré-patente), e a própria excreção de ovos não é contínua mas sim, efetuada em intervalos regulares (cíclico) (Thienpont *et al*, 1986; Wells *et al*, 1998). Adicionalmente devemos ter em conta, a estação do ano (sazonalidade) e a condição fisiológica do próprio hospedeiro (imunidade do hospedeiro) (Urquhart *et al*, 1996; Bowman *et al*, 2003).

A contagem média de ovos de um grupo de animais permite calcular o ritmo de infecção adquirida pelos equídeos e o grau de contaminação de ovos dos parasitas no meio ambiente (Wells *et al*, 1998). O que segundo os nossos resultados (Gráficos 12, 13, e 14), o aumento progressivo da eliminação de ovos poderá estar assim relacionado. Contudo, a nível individual (Indivíduo) a contagem de ovos nas fezes não se relaciona com a gravidade da infecção parasitária em causa (Wells *et al*, 1998). No que diz respeito aos valores de OPG (Gráfico 7), foram analisadas 24 amostras, nas quais apenas 3 (12,5%) obtiveram resultados positivos à observação de ovos do tipo *estrongilídeo* e dentro de estas, apenas uma amostra obteve um valor igual a 500 OPG (infecção parasitária leve) (Gráfico 8), valor que se considera no limiar para proceder à desparasitação, segundo Sousa *et al* (2010). No entanto a bibliografia é bastante díspar neste assunto sugerindo várias escalas, Soulsby (1986), considerava a desparasitação para valores iguais ou superiores a 1000 OPG, Trawford e Mulugeta (2008), no *Donkey Sanctuary* realizam as desparasitações a partir de 200 OPG pois a partir deste valor consideram que a contaminação ambiental é bastante elevada e segundo Corbett *et al* (2014), sugerem o aumento deste valor quando se procede

a um controlo da limpeza ambiental, neste caso com remoção das fezes duas vezes por semana. Foreyt e Foreyt (2001), consideram também esta avaliação subjetiva pelo facto da manifestação da sintomatologia depender de muitos fatores, inerentes ao hospedeiro, à diversidade parasitária e ao meio ambiente. Segundo Sousa *et al* (2012), no seu estudo realizado em parceria com a AEPGA, desde 2005 implementaram um controlo parasitário estratégico destes burros, onde desde 2009 não surgem infecções parasitárias graves (OPG entre 1500 e 2000), e em 2010 surgiram mais de 70% com taxas de infeção leve, sendo o restante para a taxa de infeção moderada (OPG entre 800-1000). E comparativamente com outros estudos realizados em asininos em Portugal e a nível internacional (Wells *et al*, 1998; Matthee *et al*, 2000; Ayele, Feseha, Bojia & Joe, 2006; Uslu & Guçlu, 2007; Madeira de Carvalho *et al* 2007a; Kuzmina & Kuzmin, 2007; Getachew *et al*, 2010; Abebew *et al*, 2011; Ibrahi, Berhanu, Deressa & Tolosa, 2011; Mezgebu *et al*, 2013; Sousa *et al*, 2013; Takele & Nibret, 2013), revelámos um baixo número de animais positivos à técnica de McMaster e níveis baixos de infeção. Estes resultados poderão ser explicados pelo tamanho da amostra que apresentou um número reduzido de animais, pelo curto período de tempo que envolveu o estudo e por estarem incluídos num programa de controlo parasitário.

A coprocultura é um método qualitativo, onde a abundância relativa de géneros/espécies de larvas L₃ obtidas não está diretamente relacionada com a contagem de ovos (OPG) que inicialmente se encontrou (Bowman *et al*, 2003). No entanto, a coprocultura revela-se bastante útil para o diagnóstico específico do tipo de parasitismo a nível individual como a nível coletivo, para o estudo da biodiversidade parasitária, e permite avaliar a possibilidade da presença de resistências parasitárias. Relativamente aos resultados das coproculturas (Gráfico 10), verificamos que das 24 amostras analisadas, 8 (33%) foram positivas, o que comparativamente com a técnica de McMaster, revelou um aumento percentual de 11%, o que evidencia a importância da realização deste método coprológico bem como a baixa sensibilidade da técnica de McMaster. Madeira de Carvalho *et al* (2003), referem a ciatostomiose como a parasitose intestinal mais frequente nos equídeos, o que está de acordo com os resultados do presente trabalho, que verificamos apenas a presença de strongilídeos da subfamília Cyathostominae mais concretamente do género *Cyathostomum sensu latum*. No que respeita à prevalência das espécies larvares do género *Cyathostomum sensu latum* (Gráfico 11), por ordem decrescente segundo a frequência, foi a seguinte: o morfotipo A com 83,33%, o morfotipo C com 8,04%, o morfotipo D com 3,87%, o morfotipo B com 2,98%, o morfotipo F com 1,19% e o morfotipo G com 0,60%. Esta distribuição a nível da prevalência dos morfotipos larvares mais comuns (tipo A e tipo C) está de acordo com Madeira de Carvalho *et al* (2008), no entanto relativamente ao morfotipo B apresentaram uma prevalência mais baixa, de 0,9%. Estes resultados podem ser discrepantes em relação à distribuição normalmente referida pela bibliografia no que respeita a cada morfotipo, no entanto salienta-se as mesmas causas anteriormente referidas, tamanho pequeno da

amostra, baixo nível de incidência larvar nos resultados, curto período de estudo e por estarem submetidas a um controlo parasitário estratégico.

Segundo Sousa (2009), as infecções parasitárias por estrongilídeos intestinais, em particular por ciastostomíneos, são frequentes na raça asinina de Miranda, criados em explorações tradicionais. A nível nacional (Madeira de Carvalho *et al*, 2007a; Gomes *et al*, 2007 citado por Sousa, 2009; Duro, 2010; Sousa *et al*, 2010; Sousa *et al*, 2012; Sousa *et al*, 2013), bem como a nível internacional, os resultados em estudos em asininos também corroboram os obtidos no Zimbabwe (Eysker & Pandey, 1989), África do Sul (Matthee *et al*, 2000, Matthee, Krecek & Guthrie, 2002b), Ucrânia (Kuzmine & Kuzmin, 2008), Turquia (Uslo & Guçlu, 2006), Etiópia (Getachew *et al*, 2010; Abebew *et al*, 2011) e Inglaterra (Trawford & Mulugeta, 2008) no que respeita à alta incidência da presença de ciastostomíneos. Kuzmina e Kuzmin (2007), Ucrânia, citam também que 95% dos ovos encontrados são de ciastostomíneos e principalmente do tipo A. Este resultado também foi reportado por Sousa *et al* (2012), onde refere que este panorama acontece desde 2007 e salienta a preocupação crescente para a criação de resistências parasitárias. Como foi referido, o grupo de animais avaliado está sujeito a um programa de desparasitação estratégico, com controlo dos níveis parasitários a nível individual. Este facto, aliado à desparasitação contínua e racionada com ivermectina como princípio activo, fármaco de largo espectro de ação, contra as formas parasitárias adultas e do quarto estágio larvar de pequenos estrongilídeos e para formas parasitárias adultas de grandes estrongilídeos (Brandy & Nichols, 2009), o que pode ser a causa destes animais não apresentarem populações parasitárias de grandes estrongilos, o que vai de encontro à diversidade parasitária reportada pelos países em desenvolvimento, uma vez que nestes os equídeos raramente são desparasitados (Wells *et al*, 98). Warnick (1992), citado por Sousa (2009), refere que este grupo de ciastostomíneos nos hospedeiros apresentam uma distribuição do tipo binominal negativa, em que cerca de 20% dos hospedeiros concentram cerca de 80% dos parasitas, ou seja estes 20% animais apresentam um maior poder contaminante da pastagem. Tendo em conta que são observados níveis de infeção parasitária consistentes nesta população de asininos regularmente desparasitada e que o grupo de estrongilídeos mais observado foi o género *Cyathostomum sensu latum*, os resultados podem ser preocupantes visto que estes agentes são frequentemente referenciados em equídeos regularmente desparasitados pela sua capacidade de adquirir resistência a fármacos antiparasitários (Boulkaboul, Bouakkz & Kerboeuf, 2006; Traversa *et al*, 2007; Sousa *et al*, 2013).

Uma vez que estes resultados são considerados desde 2007, o que este estudo sugere, é a necessidade de estudar a nível genético os ciastostomíneos do morfotipo A, pois estão vulgarmente associados pela bibliografia a resistências aos antiparasitários e possivelmente considerar métodos alternativos para um controlo integrado. Os ciastostomíneos devido à grande diversidade biológica e patogenia, elevado número de géneros e espécies, e

distribuição cosmopolita, revelam grande sensibilidade à maioria dos anti-helmínticos e uma grande capacidade de adaptação às novas moléculas e tipos de tratamentos, tal como já foi reportado pela bibliografia a resistência aos benzimidazóis em equinos (Baudena, 2003; Boulkaboul *et al*, 2006). Trawford, Burden e Hodgkinson (2005), em *Donkey Sanctuary* na Inglaterra reportaram um caso da presença de resistência em dois grupos de asininos para a Moxidectina, tal se devendo provavelmente à sua via de administração, pois neste ensaio terapêutico a via utilizada foi subcutânea, ao invés da *per os*, normalmente a recomendada. Por outro lado, Binev *et al* (2005) (Bulgária), e Fangama, Seri, Suliman, Imam e Mozamel (2013) (Sudão), nos seus ensaios referem resultados com boa eficácia da ivermectina parenteral em burros. A verdadeira problemática da ciatostomiose em burros é difícil de avaliar, principalmente porque a maioria da informação provém de países onde o manejo do burro é totalmente distinto e a desparasitação é praticamente ausente (países em desenvolvimento); por outra parte acresce a dificuldade em extrapolar os resultados para comparar com os estudos realizados em cavalos e póneis (Moore, 2012). Tendo em conta o objetivo da desparasitação, otimizar a saúde e o bem-estar animal, com a aplicação de uma desparasitação estratégica, certos autores consideram que pode haver uma diminuição da resistência a anti-helmínticos devido à existência do grupo *Refugium* parasitário, isto é, o grupo de animais que não foi afetado pela desparasitação, que inclui os animais não desparasitados, estados larvares enquistados nos quais o tratamento anti-helmíntico não teve acção e a contaminação larvar ambiental. Esta população parasitária pode ter um efeito de diluição, reduzindo a pressão de seleção para a resistência pelo facto de proporcionarem genes alélicos sensíveis que diluem os genes alélicos resistentes na população (Nielson, Kaplan, Thamsborg, Monrad & Olsen, 2007; Brandy & Nichols, 2009).

Em relação ao rendimento larvar, verificou-se que 5 animais apresentaram um valor de rendimento de 100% (Gráfico 15), demonstrando o poder de desenvolvimento larvar quando se proporciona as condições ambientais ideais, o que realça uma vez mais a importância da realização da técnica de coprocultura. O rendimento larvar relaciona a capacidade de eclosão das ditas larvas, e as diferenças a nível de rendimento podem estar associadas a fatores de carácter individual do hospedeiro (resistência e resiliência), competição larvar e a nível ambiental. Neste último é de destacar a possível presença de fungos nematófagos. Segundo Madeira de Carvalho *et al* (2007b), existem grupos de fungos com capacidade de atacar as formas nematóides de vida livre do ciclo exógeno dos strongilídeos (L_1 a L_3). Estes fungos são ubiqüitários, e estão presentes em todos os locais onde seja propício o seu desenvolvimento e o das formas exógenas, isto é, em solos naturais, agrícolas, pastagens e em todos os locais onde exista matéria orgânica e com elevada humidade relativa e temperatura. Apresentam uma capacidade elevada de multiplicação em fezes frescas, e também sobrevivem à passagem no sistema digestivo do animal sendo eliminado pelas fezes. Estes fungos têm a capacidade de quebrar o ciclo de vida dos parasitas através

do sequestro dos estádios larvares infetantes antes que colonizem a pastagem. A sua sobrevivência está aliada às condições climáticas presentes, e dependem da temperatura (atingem um desenvolvimento máximo a 30°C) e do nível de humidade relativa (alto) (Madeira de Carvalho *et al*, 2007b). Por outro lado, o desenvolvimento e sobrevivência dos estádios larvares infetantes apresenta-se directamente relacionado com os fatores ambientais (temperatura moderada e humidade relativa alta), o que é fulcral para a quantidade de larvas infetantes na pastagem, viabilidade e capacidade infetante. No entanto o microclima de uma pastagem baixa é mais suscetível a mudanças da temperatura e humidade, e assim, os estádios larvares podem estar particularmente vulneráveis (Urquhart *et al*, 1996).

No nosso estudo, o lameiro como por definição está naturalmente localizado em zonas edáficas húmidas (Pires *et al*, 1994), e nos meses do estudo segundo o IPMA as temperaturas médias rondaram os 15,28°C e 23,41°C, para o mês de junho e julho respetivamente. No entanto devido ao pastoreio, pisoteio e temperaturas elevadas também favoreceu a dessecação das pastagens nas zonas mais expostas. A possibilidade da interação dos fatores abióticos como a existência de focos húmidos no lameiro (zonas sombrias e nascentes de água) e a dessecação da pastagem criando microclimas, são fatores que poderiam inferir tanto na possibilidade da ação dos fungos nematófagos, bem como na ação direta das altas temperaturas que poderiam ser determinantes para impedir/reduzir o desenvolvimento exógeno dos estádios larvares de vida livre e consequentemente uma diminuição da contaminação da pastagem. Os valores do rendimento do mês de julho, dos animais foi de 0% e 0,09%, ambas com a respetiva contagem de OPG preliminar de 200 e 500 OPG, são relativamente baixos e poderiam ser assim explicados. Por outra parte, seriam necessário mais estudos, no âmbito dos fatores abióticos realçando a possibilidade da existência de fungos nematófagos nos lameiros, pois no presente estudo não foi comprovada, bem como fatores individuais do hospedeiro de carácter imunitário.

7. Considerações globais

Na nossa opinião, é relevante referir que a nível parasitário durante o período de estudo, este grupo de animais entraram e saíram praticamente sem parasitas (Gráfico 9), num estudo submetido a uma sobrepopulação no que se refere à área do lameiro, segundo o encabeçamento/ha indicado pelo IFAP. Segundo Reinemeyer (2009), e Arneberg *et al* (1998), citado por Sousa (2009), a pastagem, aliada a uma elevada densidade animal apresenta uma correlação positiva com o parasitismo gastrointestinal, em especial por strongilídeos. Isto acontece porque a sobrepopulação conduz a uma diminuição progressiva da altura da pastagem, intensificando a viabilidade dos estádios larvares altamente concentrados. Por outro lado, a menor disponibilidade de erva na pastagem leva

o animal a comer mais perto das zonas de defecação, e aumenta a possibilidade de se contaminarem (Urquhart *et al*, 1996). Segundo Waller *et al* (2001), as pastagens oferecem o ambiente ideal para as formas parasitárias de vida livre, e ao considerar as diferentes dinâmicas existentes numa pastagem – fases de crescimento, condições climáticas – pode facilitar ou impedir a sobrevivência destas formas parasitárias e por isso existem épocas de maior ou menor risco de infeção.

Segundo Madeira de Carvalho *et al* (2007a), como foi já referido, existe uma variação sazonal do número de ovos de estrongilídeos eliminados nas fezes, com um pico na primavera associado à saída de larvas de ciatostomíneos após a hipobiose, e outro pico no Verão pela reinfeção e com PPP mais curto devido as condições climáticas. Desta forma as épocas de maior risco de infeção são a primavera e verão, que coincidem com a época de maior pastoreio. Não foi possível fazer este tipo de relações durante o nosso estudo, pois seria necessário prolongar o período de estudo para a determinação dos picos de eliminação de ovos. No entanto, observamos um pico de OPG em Setembro de 2013, reportado por Sousa (comunicação pessoal, Janeiro 2014), dois meses posteriores à saída dos animais do lameiro em estudo (Gráfico 9). O curto PPP (cerca de 2 meses) dos ciatostomíneos, leva a acreditar que os animais contaminaram-se durante o estudo realizado. Por outra parte, é relevante considerar as possíveis fontes de contaminação, como o local do confinamento noturno (*Regada*) onde se concentram com os demais animais, a duplicação da carga animal durante 15 dias no lameiro a meio do estudo para a diminuição da disponibilidade de alimento (contaminação do lameiro por animais externos), e do próprio lameiro em estudo, que não era pastoreado há cerca de 1 ano. No entanto, as formas infetantes apresentam capacidade de hipobiose e poderiam ter resistido. O factor *stress*, devido à alteração dos hábitos diários com o regresso dos animais à *Regada*, pode baixar a resistência e a resiliência do hospedeiro em lidar com a população parasitária, desencadeando um pico de OPG em Setembro.

Paralelamente houve uma ligeira descida da média das condições corporais (Tabela 13), com o caso de dois animais que desceram meio ponto, numa escala de 1 a 5 (Trawford & Mulugueta, 2008). Este dado foi recolhido devido ao impacto negativo causado pelo parasitismo, que pode ser considerado como um indicador do estado nutricional e de avaliação de bem-estar animal (Pearson & Mohammed, 2000; Matthee *et al*, 2000; Matthee *et al*, 2002a; Pritchard, Lindberg, Main & Whay, 2005). Ayele *et al* (2006), e Takele e Nibret (2013), em estudos diferentes mas ambos na Etiópia, referem a correlação negativa obtida entre a carga parasitária e a condição corporal. Segundo, Ayele *et al* (2006), os estrôngilos (grandes e pequenos) são os parasitas que mais debilitam o estado geral dos asininos. Coop e Kyriazakis (2001), citam o efeito direto da nutrição sobre a população parasitária através da ingestão de compostos antiparasitários naturais. Waller e Thamsborg (2004), referem a existência de metabolitos secundários presentes nas plantas que constituem a

dieta, associados a efeitos benéficos para a saúde animal, além da sua contribuição direta na nutrição do animal, chamando a esta situação, *Pastagens bioativas* ou *pastagens medicinais*. Estes metabolitos são considerados vulgarmente como compostos anti nutricionais por estarem associados ao sabor amargo, adstringente e provocam aversão por parte dos animais, no entanto existem estudos que têm vindo a quebrar estes conceitos, principalmente no que se refere aos CT. Existem taninos hidrolisáveis e CT, como foi referido, sendo estes últimos mais comuns e existem em quase todo o tipo de flora principalmente em árvores e arbustos (Barry *et al*, 2001), e fazem parte do leque de defesas das plantas (Coop & Kyriazakis, 2001). Os CT têm revelado que perante um doseamento e frequência de administração corretos apresentam bons resultados e sendo os maus resultados associados à sobredosagem e à estrutura do tanino, no que respeita à ação desparasitante (Iqbal, Mufti & Khan, 2002; Durmic & Blache, 2012). Estudos realizados em ovelhas (Lisonbee *et al*, 2009) e cabras (Osoro *et al*, 2006; Frutos *et al*, 2009), obtiveram bons resultados devido a ação direta dos taninos com a diminuição de OPG, ação inibitória da eclosão dos ovos (Min & Hart, 2003), redução da fertilidade das fêmeas parasitas e promoção do aumento da eliminação de formas adultas parasitárias (Lisonbee *et al*, 2009). Indiretamente estes compostos atuam no metabolismo dos ruminantes após o consumo, pois revelam uma notória afinidade para as proteínas e em menor intensidade para os hidratos de carbono. Em ambiente de pH neutro (6,0-7,0) associam-se às proteínas no rúmen e quando passam para o abomaso (pH ácido) dissociam-se, deste modo promove uma proteção da proteína, aumentam o aporte de aminoácidos para a absorção (Iqbal *et al*, 2002, Min & Hart, 2003), o que permite um melhor aproveitamento do alimento e revela-se interessante como uma terapia natural nos casos de parasitismo intestinal, pois os animais que exibem diarreia apresentam perdas de proteína. É suscetível pensar na associação dos taninos e seus efeitos na alimentação dos asininos, pelo tipo de comportamento alimentar que apresentam, apesar das diferenças anatómicas com as espécies estudadas até ao momento. No entanto até à data, e tanto quanto pudemos constatar, não existem estudos em animais não-ruminantes, o que pode ser este facto não viável para espécie, por isso seria interessante poder desenvolver mais investigações nesta área, tanto para a espécie asinina como para as diversas espécies pecuárias.

A ocupação da pastagem pelos animais, revelou ao longo do estudo um aproveitamento cada vez mais eficiente por parte dos asininos, com um aumento gradual de tempo de pastoreio na Zona 6 (zona com maior disponibilidade alimentar, maior quantidade de plantas arbustivas e mais sombra). A utilização da pastagem também revelou a capacidade exploradora dos asininos bem como a alta capacidade para o pastoreio com hábitos selectivos.

No que se refere à composição da dieta, ao analisar os resultados de observação comportamental e pelos resultados obtidos de n-alcanos na primeira época de estudo,

optou-se no segundo período de observações de comportamento realizar a recolha dos dados observacionais do tipo de alimento que os animais consumiam, Herbáceas ou Arbustivas, onde verificamos que 20% do tempo disponibilizado foi para o consumo de arbustivas em julho (Gráfico 4). No entanto, de acordo com os resultados obtidos pelo método de n-alcanos na segunda época, o consumo de arbustivas apenas constituiu 2% da dieta selecionada. Esta discrepância de valores pode ser pelo facto:

- Observação comportamental errónea. No entanto o lameiro permitia comprovar através da observação onde as burras pastavam;
- Maior tempo despendido pelas burras na mastigação e seleção das espécies arbustivas, visto que nesta época observacional os arbustos estavam mais lenhificados comparativamente com o mês anterior;
- Animais poderiam estar a pastar e a ingerir herbáceas que eventualmente estavam sob o coberto de arbustivas;
- As espécies amostradas numa pastagem heterogénea para análise descritiva dos padrões de n-alcanos necessita que essas amostras sejam representativas das plantas comumente consumidas pelos animais (Chen *et al*, 1999), o que pode ter acontecido na 2ª época de estudo, onde as amostras recolhidas de arbustivas não tenham sido representativas do consumo real deste tipo de alimento.

Segundo o que foi referido na análise da vegetação relativamente à altura da pastagem, e visto os resultados da composição da dieta pelos n-alcanos na segunda época de estudo, com um consumo praticamente exclusivo de herbáceas, leva-nos a pensar que houve um melhor aproveitamento do lameiro, concordando com Moreira *et al* (2001).

Por último, o aumento da temperatura (ao estimular o desenvolvimento das formas exógenas dos estrongilídeos), a maior possibilidade de reinfecção na Primavera com as L₃ na pastagem e o maior consumo de plantas herbáceas em detrimento das arbustivas (e consequentemente com menor consumo de CT), poderão explicar a subida de OPG e a maior contaminação da pastagem ao longo do nosso estudo.

VIII. Conclusão

A compreensão do manejo das pastagens, associada a um controlo integrado parasitário é uma tarefa interdisciplinar, onde todavia existe a necessidade de mais estudos para uma melhor utilização da pastagem. É essencial uma visão global do lameiro, e cada pastagem ou floresta é particular devendo ter um tratamento ajustado e racional, e não pode ser generalizado como tem acontecido no nosso país, devido a políticas desajustadas, promovendo o aumento contínuo do desuso e o abandono da gestão destes campos.

Neste trabalho, os asininos revelaram-se como animais bastante seletivos e exploradores, contribuindo para o impacto ambiental (a nível visual) de uma paisagem, com o consumo da vegetação natural. No entanto, este deverá ser controlado segundo os objectivos pretendidos e após aprofundar melhor os conhecimentos das suas necessidades alimentares.

A técnica dos n-alcanos torna-se uma ferramenta importante para a compreensão das escolhas alimentares. Os alcanos ímpares naturais mais representativos do lameiro em estudo, foram C_{29} e C_{31} , sendo predominante o primeiro para as Arbustivas e o segundo para as Herbáceas. Segundo esta técnica, o consumo de arbustivas pode alcançar até cerca de 34,2% da dieta consumida (valor observado na 1ª época de estudo). Em julho houve uma diminuição clara do consumo deste alimento, segundo a técnica de n-alcanos. Os burros de Miranda apresentaram uma preferência alimentar por espécies herbáceas, no entanto com selecção de uma grande quantidade de espécies vegetais lenhosas, mesmo quando a disponibilidade de herbáceas foi alta na sua dieta, o que pode demonstrar a necessidade de uma dieta rica em compostos fibrosos e com possíveis níveis significativos de CT.

A nível parasitário, revelou-se interessante pelo facto não se terem observado níveis preocupantes de infeção parasitária ao longo do estudo, no entanto, observamos uma presença predominante de ciatostomíneos. As medidas de controlo devem ser focalizadas para um controlo eficaz da população destes parasitas, ou seja além do controlo estratégico, sugere-se a hipótese de incluir técnicas de controlo integrado, devido à problemática crescente relativa à resistência aos anti-helmínticos contra estes parasitas, e uma maior disponibilidade de plantas arbustivas na dieta, com um elevado teor de CT, o que poderá contribuir para este efeito.

Este trabalho por um lado foi desafiante, mas por outro também procurou ser inovador, tanto na espécie em estudo, como no cruzamento de metodologias e resultados efetuados.

IX. Trabalhos futuros

Neste contexto urge a necessidade de compreender e valorizar as capacidades adaptativas do burro, nomeadamente como animal de aproveitamento e limpeza de pastagens, coassociado à valorização dos lameiros. Por isso sugerimos as seguintes linhas de trabalhos futuros:

- Compreensão das necessidades nutritivas, do comportamento alimentar e do funcionamento do sistema digestivo da espécie asinina.
- Realização de uma amostragem da pastagem e identificação botânica, para um melhor conhecimento da composição do lameiro, bem como, delinear novos ensaios no âmbito da metodologia dos n-alcanos, dado que a espécie asinina é pouco estudada. Com o intuito de conseguir uma melhor eficácia da técnica de n-alcanos e uma melhor gestão da pastagem. Uma possibilidade para aumentar o nível de confiança da composição da dieta, é o uso de um grande número de marcadores dos compostos da dieta. O uso de outros marcadores como complemento ou alternativa, como os ácidos gordos de cadeia longa e os alcoóis de cadeia longa, tem a vantagem que a sua quantificação e separação não adiciona muito mais trabalho como extensão do protocolo para n-alcanos (Ali *et al*, 2004). A combinação de marcadores fornece uma impressão digital mais específica de cada componente da dieta, o que desta forma aumenta o poder discriminatório entre as espécies de plantas (Ferreira *et al*, 2009) e permite uma melhoria da precisão das estimativas da composição da dieta.
- Realização do controlo da contaminação larvar da pastagem, visto que, no nosso País, segundo Pereira da Fonseca e Madeira de Carvalho (2008), tem-se evidenciado um nível de contaminação das pastagens durante todo o ano, inclusive durante as estações frias (Inverno) e quentes (Verão), quando tradicionalmente se considera estas épocas com um nível de contaminação baixo.
- Estudos na área do controlo integrado, com pesquisa de fungos nematófagos e também do efeito de certos metabolitos secundários integrantes na dieta, como os CT e os seus efeitos anti-parasitários, dada a riqueza florística da região de Trás-os-Montes.
- Estudos a nível genético dos ciatostomíneos do tipo A.

Adicionalmente, este trabalho também pode orientar outras áreas de investigação, como na botânica, agronomia e engenharia florestal, visto que a gestão e protecção destes animais e paisagens visa uma abordagem interdisciplinar.

X. Bibliografia

- AEPGA (2012). *Associação para o Estudo e Protecção do Gado asinino*. Acedido em Dezembro, 2013, disponível em <http://www.aepga.pt/>
- Abebew, D., Endebu, B., Gizachew, A. (2011). Status of parasitism in donkeys of project and control areas in central region of Ethiopia: a comparative study. *Ethiop. Vet. J.*, 15 (2), 45-55.
- Afonso, F., Candeias, G., Pratas, M. (2013). *Raças Autóctones Portuguesas*. Lisboa: Direcção Geral de Alimentação e Veterinária, 39-43p.
- Aganda, A.A., Tsopito, C.M. (1998). A note on the feeding behaviour of domestic donkeys: a Botswana case study. *Appl. anim. behav. Sci.*, 60, 235-239.
- Ali, H. A. M., Mayes, R. W., Lamb, C. S., Hector, B. L., Verma, A. K., Rskov, E. R. Ø., (2004). The potential of long-chain fatty alcohols and long-chain fatty acids as diet composition markers: development of methods for quantitative analysis and faecal recoveries of these compounds in sheep fed mixed diets. *Journal of Agricultural Science*, 142, 71–78.
- Arias, M., Cazapal-Monteiro, C., Suárez, J., Mugélez, S., López-Arellano, M.E., Suárez, J.L., Mendoza de Gives, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. (2013). A combined trial of chemotherapy and biological control measures against parasites. In Grazing horses. In Saastamoinen, M., Fradinho, M.J., Santos, A.S., Miraglia, N.A (Eds.), *Forages and grazing in horse nutrition*, EAAP publication No.132, pp. 413-418. Holanda: Wageningen Academic Publishers.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). *Official Methods of Analysis*. 14 th Edition, Vol. 1, AOAC, Washington DC, USA, 684 pp.
- Ayele G.; Feseha G.; Bojia E.; Joe A. (2006). Prevalence of gastro-intestinal parasites of donkeys in Dugda Bora District, Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, 18 (136). (artigo electrónico, disponível em <http://www.lrrd.org/lrrd18/10/ayel18136.htm>).
- Barbosa, J.C. (2003). O gado asinino em Trás-os-Montes. Contribuição para o conhecimento da sua importância socio-económica. Bragança: *Acta do V Colóquio Hispano-Português de Estudos Rurais*, Outubro 23 e 24.
- Barry, T. N.; McNabb, W. C. (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Br. J. Nutr.* 81:263–272.
- Barry, T. N.; McNeill, D. M.; McNabb, W. C. (2001). Plant secondary compounds; their impact on nutritive value and upon animal production. (pp.445–452) In *Proc. XIX Int. Grass. Conf.*, Sao Paulo, Brazil.
- Baudena, M.A. (2003). *Equine immunity to cyathostome infections*. Dissertations to graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Binev, R., Kirkova, Z., Nikolov, J., Russenov, A., Stojanchev, K., Lazarov, L., Hristov, T. (2005). Efficacy of parenteral administration of ivermectin in the control of strongylidosis in donkeys. *Tydskr.S.Afr.vet.Ver.*, 76(4), 214–216.

- Blondel, J., Aronson, J. (1999). *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*. Oxford: University Press.
- Bowman, D.D.; Lynn, R.C.; Eberhard, M.L.; Alcaraz, A. (2003). *Georgis Parasitology for Veterinarians*, (8ª edição), (pp. 174-180; 287-300). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Boukhaboul, A., Bouakkz, A., Kerboeuf, D. (2006). Détection d'une résistance aux benzimidazoles chez les strongles digestifs du cheval en Algérie. *Revue Méd. Vét.*, 157(2), 59-64
- Brady, H.A., Nichols, W.T. (2009). Drug resistance in equine parasites: an emerging global problem. *Journal of equine veterinary science*, 29, nº 5, 285-295.
- Bugalho, M. N., Mayes R. W., Milne J. A. (2002). The effects of feeding selectivity on the estimation of diet composition using the n-alkane technique. *Blackwell Science Ltd. Grass and Forage Science*, 57, 224–231.
- Burden, F. (2011). Review article: Practical feeding and condition scoring for donkeys and mules. *Equine veterinary education, AAEP*, 1-8.
- Canacoo, E.A., Avornyo, F.K. (1998). Daytimes activities of donkeys at range in the coast savanna of Ghana. *Appl. anim. behav. Sci.*, 60, 229-234.
- Carta dos solos, carta do uso actual da terra e carta da aptidão da terra do nordeste de Portugal, Anexos* (1991). Agroconsultores e coba, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Projeto de desenvolvimento rural integrado de Trás-os-Montes.
- Carretero-Roque L, Colunga B, Smith D G, Gonzalez-Ronquillo M, Solis-Mendez A, Castelan-Ortega O (2005). Digestible Energy Requirements of Mexican Donkeys Fed Oat Straw and Maize Stover. *Tropical Animal Health and Production*, 37, supplement 1, 123-142.
- Chen, W., Scott, J.M., Blair, G.J., Lefroy, R.D.B. (1999). Using plant cuticular alkanes to study plant-animal interactions on pastures. *Can. J. Anim. Sci.*, 79, 553-7.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I. (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol*, 17, 325–330.
- Corbett, C.J., Love, S., Moore, A., Burden, F.A., Matthews, J.B., Denwood, M.J. (2014). The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys. *Parasites & Vectors*, 7(48), 1-15.
- Cosyns, E., Degezelle, T., Demeulenaere, E., Hoffmann, M. (2001) Feeding ecology of Konik horses and donkeys in Belgian coastal dunes and its implications for nature management, *Belg. J. Zool.*, 131, 111-118.
- Darwin, C. (1920). *Origem das espécies*. (ed., 2009) Lisboa: Lello Editores.
- D'Andrade, R. (1939). O Burro. *Bolm Pec*, 7 (1): 5-41.
- Dill, D.B., Yousef, M.K., Cox, C.R., Barton R.G. (1980). Hunger vs thirst in the burro (*Equus Asininus*). *Pergamon Press and Brain Research Publ., Physiology & Behaviour*, 24, 975-978

- Dittrich, J.R., Melo, H.A., Afonso, A.M.C.F., Dittrich, R.L. (2010). Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. *R. Bras. Zootec.*, 39 (supl. especial), 130-137.
- Dove, H., Mayes, W. (1991). The Use of Plant Wax ALkanes as MArker Substances in Studies of the Nutrition of Herbivores: A review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 42, 913-952.
- Dove, H. (1992). Using the n-alkanes of plant cuticular wax to estimate the species composition of herbage mixtures, *Australian Journal of Agricultural Research*, 43, 1711 ± 1724.
- Dove, H., Moore, A.D. (1995). Using a least-squares optimization procedure to estimate botanical composition based on the alkanes of plant cuticular wax. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46, 1535-44.
- Dove, H., Mayes, R.W. (1996). Plant wax components: A new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. *American Institute of Nutrition*, 126, p.13-26.
- Dove, H., Mayes, R.W., Freer, M. (1996). Effects of species, plant part, and plant age on the n-alkane concentrations in the cuticular wax of pasture plants. *J. Agriculture Research*, 47, 1333-47.
- Dove, H. (1998). Pastures and grazing animals—the interaction continues. *Anim. Prod. Aust.*, 22, 3–13.
- Dove, H., Mayes, R.W. (2005). Using n-alkanes and other plant wax components to estimate intake, digestibility and diet composition of grazing/browsing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 59, 123–139.
- Dove, H., Mayes, R.W. (2006). Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. *Nature Protocols*, 1 (nº4), 1680-1697.
- Dumont, B., Meuret, M., Boissy, A., Petit, M. (2001). Le pâturage vu par l'animal: mécanismes comportementaux et applications en élevage. *Fourrages*, 166, 213-238.
- Durmic, Z., Blanche, D. (2012). Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal feed science and technology*, 176, 150-162.
- Duro, L.S. (2010) - *Parasitismo gastrintestinal em animais da quinta pedagógica dos olivais. Especial referência aos mamíferos ungulados*. Dissertação de Mestrado integrado em Medicina Veterinária (pp.135). Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Eysker, M., Pandey, V.S. (1989). Small strongyle infections in donkeys from the Highveld in Zimbabwe. *Veterinary parasitology*, 30, 345-349.
- Fangama, M.I., Seri, H.I., Suliman, S.E., Imam, S.M.A., Mozamel, E.A. (2013). Comparative efficacy evaluation of moxidectin and ivermectin injectable formulation against helminthes infestation of donkeys (*Equus asinus*) in Sudan. *Assiut Vet. Med. J.*, 59 (137), 1-8.
- Ferreira, L.M.M., Oliván, M., Rodrigues, M.A.M., García, U., Osoro, K. (2005). Validation of the alkane technique to estimate diet selection of goats grazing heather-gorse vegetation communities. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 1636–1646.

- Ferreira, L. M. M, García, ., U., Rodrigues, M. A. M., Celaya, R., Dias-da-Silva, A., Osoro K. (2007). The application of the n-alkane technique for estimating the composition of diets consumed by equines and cattle feeding on upland vegetation communities. *Animal Feed Science and Technology*, 138, 47–60.
- Ferreira, L.M.M., Celaya, R., García, U., Rodrigues, M.A.M., Osoro, K. (2009). Differences between domestic herbivores species in alkane faecal recoveries and the accuracy of subsequent estimates of diet composition. *Animal feed science and technology*, 151, 128-142.
- Ferreira, L.M., Celaya, R., Santos, A.S., Falco, V., Guedes, C., Rodrigues, M.A.M., Osoro, K. (2010). Comparison of long-chain fatty acids and alkanes as markers to estimate diet composition of equines and cattle consuming heathland vegetation species. *Livestock Science*, 131, 260-271.
- Ferreira, L.M., Celaya, R., Benavides, R., Jáuregui M., García, U., Santos, A.S., García, R.R., Rodrigues, A.M., Osoro, K., (2013). Foraging behaviour of domestic herbivore species grazing on heathlands associated with improved pasture areas. *Livestock Science*, 155, 373–383.
- French, J. (1999). *Interacción social*. In Svendsen, E.D (Ed.), *Manual Profesional del Burro*, (3ª Ed, pp 113-124) Sidmouth: Whittet Books, London.
- Frutos, P., Moreno-Gonzalo, J., Hervás, G., García, U., Ferreira, L.M.M., Celaya, R., Toral, P.G., Ortega-Mora, L.M., Ferre, I., Osoro, K. (2009). Is the anthelmintic effect of heather supplementation to grazing goats always accompanied by antinutritional effects, Options Méditerranéennes, *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*, A, nº.85, 43-48.
- Foreyt, W.J., Foreyt, B. (2001). *Veterinary parasitology reference manual*. Oxford: Wiley-Blackwell
- Fukumoto, N.M., Damasceno, J.C., Côrtes, C., Roehsig, L., Rego, F.C.A., Cecato, U., Branco, A.F. (2007). Uso de n-alcanos na estimativa da composição botânica da dieta em ovinos alimentados com diferentes proporções de *Brachiaria decumbens* Stapf e *Arachis pintoi* Koprov e Gregory. *R. Bras. Zootec.*, 36, n.4, 1147-1154.
- Galli, J.R., Cangiano, C.A., Fernández, H.H. (1996). Comportamiento Ingestivo y consumo de Bovinos en Pastoreo, *Rev. Arg Prod. Anim*, 16(suplemento 2): 119-42.
- García, R.R., Fraser, M.D., Celaya, R., Ferreira, L.M.M., García, U., Osoro, K. (2013). Grazing land management and biodiversity in the Atlantic European heathlands: a review. *Agroforest Syst.*, 87, 19–43 .
- Gebread, F. (1999). *Enfermedades y problemas de salud en los burros del extranjero*. In Svendsen, E.D (Ed.), *Manual Professional del burro*. (3ª Ed, pp 167-186) Sidmouth: Whittet Books, London
- Getachew, A.M, Trawford A.F., Feseha, G., Reid S.W.J. (2010). Gastrointestinal parasites of working donkeys in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 27-33.
- Gudmundsson, O., Dyrmondsson, O.R. (1994). Horse grazing under cold and wet conditions: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 40, 57-63.
- Gudmundsson, O., Thorhallsdottir, A.G. (1998). Evaluation of n-alkanes for intake and digestibility determination in horses. *Techniques for investigating intake and ingestive*

- behaviour by farm animals, IXth European Intake Workshop* (1-4), 18 – 20 Novembro. North Wyke, Devon, UK: IGER.
- Hutchings, M. R., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Gordon, I. J. (2003). Can animals use foraging behaviour to combat parasites?. In *Nutrition and behaviour Group Symposium - 'Exploitation of medicinal properties of plants by animals and man through food intake and foraging behaviour* (pp.361-370). Proceedings of the Nutrition Society.
- Ibrahim, N., Berhanu, T., Deressa, B., Tolosa, T. (2011). Survey of prevalence of helminth parasites of donkeys in and around Hawassa Town, Southern Ethiopia. *Global veterinaria*, 6 (3), 223-227.
- Instituto da Conservação da Natureza (ICN), *Plano de ordenamento do parque natural do Douro internacional, 1ª fase* (2001), Lisboa
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), *Boletim Climatológico Mensal – Portugal Continental, junho de 2013*, (1-12), acedido em Dezembro 2013, disponível em http://www.ipma.pt/resources/www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20131028/gfgbCRYqyeBYoxthvwOH/cli_20130601_20130630_pcl_mm_co_pt.pdf
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), *Boletim Climatológico Mensal – Portugal Continental, julho de 2013*, (1-12), acedido em Dezembro 2013, disponível em http://www.ipma.pt/resources/www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20130806/kKv_oJdOTQHFMlWXXuCkp/cli_20130701_20130731_pcl_mm_co_pt.pdf
- Iqbal, Z., Mufti, K.A., Khan, M. (2002). Review: Anthelmintic effects of condensed tannins. *International journal of agriculture & biology*, 4(3), 438-440.
- Izraely, H., Choshniak, I., Stevens, C.E., Demment, M.W., Shkolnik, A. (1989). Factors determining the digestive efficiency of the domesticated donkey (*Equus asinus asinus*). *Quarterly journal of experimental physiology*, 74, 1-6.
- Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas (IFAP), acedido em Janeiro 2014 http://www.ifap.min-agricultura.pt/portal/page/portal/ifap_publico/GC_drural/GC_proder/GC_vmp_L/GC_pbd_R
- Kaplan, R. M. and M. K. Nielsen (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22(6), 306-316.
- Kassai, T. (1999). *Veterinary helminthology*, Elsevier Health Science.
- Kuzmina, T. A., Kuzmin, Yu. I. (2007). The community of strongylids (nematoda, strongylida) of working donkeys (*Equus asinus*) in Unkraine. *Vestnik zoologii*, 42 (2), 18-23.
- Kyriazakis, I., Houdijk J. (2006). Immunonutrition: Nutritional control of parasites. *Small Ruminant Research*, 62, 79–82.
- Lamoot, I., Callebaut, J., Demeulenaere, E., Vandenberghe, C. and Hoffmann, M. (2005). Foraging behaviour of donkeys grazing in a coastal dune area in temperate climate conditions. *Appl. anim. behav. Sci.*, 92, 93-112.
- Lisonbee, L. D. , Villalba, J. J., Provenza, F. D, Hall, J. O. (2009). Tannins and self-medication: Implications for sustainable parasite control in herbivores. *Behavioural Processes*, 82, 184–189.

- Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A.; Dvojnós, G.M. (2008). Illustrated identification keys to strongylid parasites (strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae), *Veterinary Parasitology*, 156 (1-2), 4-161.
- Love, S., Murphy D., Mellor, D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*, 85 (1999), 113–122.
- Madeira de Carvalho, L.M. (2001). *Epidemiologia e controlo da estrongilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal*. Tese de Dissertação de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Madeira de Carvalho, L.M., Afonso-Roque, M.M., Fazendeiro, M.I. (2003). Morfotipos de L₃ do género *Cyathostomum* sensu lato (Nematoda: Strongyloidea) - Aplicações no estudo do parasitismo por ciatostomíneos em equinos. *VII Cong. Port. Parasitol., Soc. Port. Parasitol., Inst. Hig. Med. Trop., Lisboa*, 9-11 Abril 2003. *Acta Parasitol Port*, (Com. Oral).
- Madeira de Carvalho, L.M. (2006). Os equídeos em Portugal: de animais de produção a animais de companhia. I – Impacte nas Doenças Parasitárias. *Medicina Veterinária. Revta. da AEFMV*, 62, 13-24.
- Madeira de Carvalho, L.M., Gomes, L., Cernea, M., Cernea, C., Bernardes, N., Rosário, M.A., Santos, C.A., Soares, M. J., Fazendeiro, I. (2007a). Parasitismo gastrintestinal e seu controlo em asininos e híbridos estabulados, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102 (563-564), 225-231.
- Madeira de Carvalho, L. M., Gillespie, A. T., Serra, P. M., Bernardo, F. A., Farrim, A. P., Fazendeiro, I. (2007b). Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrongilidose equina no Ribatejo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, pp. 233-247.
- Madeira de Carvalho, L.M., Fazendeiro, M.I.; Afonso-Roque, M.M. (2008). Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos. 3. Conclusões, perspectivas futuras e proposta de chave de identificação de alguns nemátodes gastrintestinais mais comuns dos equídeos em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15 (1/2), 59-65.
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., Borowy, N.K, Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. *J. Sci. Food Agric.*, 61, 161-165.
- Manteca, X., Villalba, J.J., Atwood S.B., Dziba L., Provenza F.D., (2008). Is dietary choice important to animal welfare?, *Journal of Veterinary Behavior*, 3, 229-239.
- Matthee, S., Krecek, R.C., Milne, S.A. (2000). Prevalence and biodiversity of helminth parasites in donkeys from south Africa. *J. Parasitol.*, 86 (4), 756-762.
- Matthee, S., Krecek R.C., Mil, S.A., Boshoff, M., Guthrie, A.J. (2002a). Impact of management interventions on helminth levels, and body and blood measurements in working donkeys in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 107, 103–113.
- Matthee, S., Krecek R.C., Guthrie, A.J. (2002b). Effect Of Management Interventions on the helminth parasites recovered from donkeys in South Africa. *J. Parasitol.*, 88 (1), 171–179.

- Marques, M.H.A.G. (2006). *O burro miradês: A identificação de um património. Estudo de caso numa aldeia da Terra de Miranda*. Mestre em Antropologia: Patrimónios e Identidades. Lisboa: Instituto Superior de Ciências do Trabalho e da Empresa.
- Mascarenhas-Ferreira, A., Kersten, J., Gast, C.H. (1983). The study of several modifications of the neutral detergent procedure. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, 9, 19-28.
- Mayes, R.W., Lamb, C.S., Colgrove, P.M. (1986). The use of dosed and herbage n-alkanes as markers for the determination of herbage intake. *J. Agric. Sci., Camb.*, 107, 161-170.
- Mayes, R. W., Beresford, N. A., Lamb, C. S., Barnett, C. L., Howard, B. J., Jones, B-E. V., Eriksson, O., Hove, K., Pedersen, O., and Staines, B.W. (1994). Novel approaches to the estimation of intake and bioavailability of radiocaesium in ruminants grazing forested areas. *Science of the Total Environment*, 157, 289-300.
- Mayes, R.W., Dove, H. (2000). Measurement of dietary nutrient intake in free-ranging mammalian herbivores. *Nutrition Research Reviews*, 13, 107±138.
- Mayes, R.W., Dove, H. (2006). The use of n-alkanes and other plant-wax compounds as markers for studying the feeding and nutrition of large mammalian herbivores. In Sandoval-Castro, C.A., DeB Hovell, D.B., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A. (Eds.), *Herbivores: The Assessment of Intake, Digestibility and the Roles of Secondary Compounds*, BSAS Publication No. 34, (153–182). Nottingham, UK.
- Mezgebu, T., Tafess, K., Tamiru, F. (2013). Prevalence of Gastrointestinal Parasites of Horses and Donkeys in and around Gondar Town, Ethiopia. *Open Journal of Veterinary Medicine*, vol. 3, 267-272. Acedido em Outubro 2013 em <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2013.36043>
- Min, B.R., Hart, S.P. (2003). Tannins for suppression of internal parasites, *J. Anim. Sci.*, 81, 102-109.
- Moore, A.J. (2012). Assessment of sustainable methods of cyathostomin control at the Donkey Sanctuary Devon. Master of Veterinary Medicine. Glasgow: School of Veterinary Medicine, College of Medicine, Veterinary and Life Sciences.
- Moreira, N., Aguiar, C., Pires, J.M. (2001). *Medidas agro-ambientais. 3.3. Lameiros e outros prados e pastagens de elevado valor florístico – pastagens de montanha*, Lisboa: Direcção-Geral e Desenvolvimento Rural.
- Mueller, P.J., Protos, P., Hout, K.A., Van Soest, P.J., (1998). Chewing behaviour in the domestic donkey (*Equus asinus*) fed fibrous forage. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 60, 241-251.
- Nielsen, M.K., Kaplan, R.M., Thamsborg, S.M., Monrad, J., Olsen, S.N. (2007). Review: Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: Implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *The Veterinary Journal*, 174, 23-32.
- Oliván, M., Osoro, K. (1999). Effect of temperature on alkane extraction from faeces and herbage. *J. Agric. Sci., Camb.*, 132, 305-312.
- Oliveira, D.E., Prates, E.R. (2000). The utilization of plant wax components, especially n-alkanes, in ruminants nutrition studies, *Ciência Rural*, Santa Maria, 30, n. 3, 549-557.

- Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Frutos, P., Garcia, U., Ortega-Mora, L.M., Ferreira, L.M.M., Celaya, R., Ferre, I. (2006). Anthelmintic and nutritional effects of heather supplementation on Cashmere goats grazing perennial ryegrass-white clover pastures. *J. Anim. Sci.*, 85, 861-870.
- Pearson, R.A., Archibald, R.F. and Muirhead, R.H. (2001). The effect of forage quality and level of feeding on digestibility and gastrointestinal transit time of oat straw and alfalfa given to ponies and donkeys, *Br. J. Nutr.*, 85, 599-606.
- Pearson, R.A., Archibald, R.F. and Muirhead, R.H. (2006). A comparison of the effect of forage type and level of feeding on the digestibility and gastrointestinal mean retention time of dry forages given to cattle, sheep, ponies and donkeys. *Br. J. Nutr.*, 95, 88-98.
- Pearson, R.A., Merrit, J.B. (1991). Intake, digestion and gastrointestinal transit time in resting donkeys and ponies and exercised donkeys given ad libitum hay and straw diets. *Equine veterinary journal*, 23, 339-343.
- Pearson, R.A., Mohammed, O. (2000). *A guide to live weight estimation and body condition scoring of donkeys*. Centre for tropical veterinary medicine – University of Edinburgh, 1-25.
- Pereira, L.S.; Sousa, V.S. (2005). Lameiros e prados de lima, uma paisagem das terras altas húmidas de Portugal, Comunicação apresentada no V Seminário Internacional CYTED-XVII: *Un enfoque para la gestión sustentable del agua: Experiencias en zonas húmedas*, Abril 2005. Argentina: Universidad de Buenos Aires.
- Pereira da Fonseca, I.M.; Madeira de Carvalho, L.M. (2008). Influência das alterações climáticas nos quadros epidemiológicos regionais das parasitoses dos pequenos ruminantes. Livro de Resumos do IV Congresso de Ciências Veterinárias da SPCV, I Congresso Ibérico de Epidemiologia, INRB-INIA/Fonte Boa, 27-29 de Novembro 2008. Comunicação Oral a convite da Organização, pp. 80.
- Pires, J.M., Pinto, P.A., Moreira, N.T. (1994). *Lameiros de Trás-os-Montes. Perspectivas de futuro para estas pastagens de montanha*. Série Estudos nº 29: Instituto Superior Politécnico de Bragança, 17-60p.
- Plieninger, T., Höchtla, F., Spekb, T. (2006). Traditional land-use and nature conservation in European rural landscapes, *Environmental Science & Policy*, 9, 317-321.
- Pôças, I., Cunha, M., Pereira L.S. (2006). Pastagens Seminaurais de Montanha: Lameiros, Sistemas Ancestrais no Século XXI. *Taller CYTED XVII, El Agua en Ibero-América: Tecnologías Apropriadas e Tecnologías Ancestrales*, Lima: Universidad Nacional de Piura-Peru.
- Pritchard, J.C., Lindberg, A.C., Main, D.C.J., Whay, H.P. (2005). Assessment of the welfare of working horses, mules and donkeys, using heath and behaviour parameters. *Preventive Veterinary Medicine*, 69, 265-283.
- Provenza F.D., Villalba, J.J., Dziba, L.E., Atwood, S.B., Banner R.E. (2003). Linking herbivore experience, varied diets, and plant biochemical diversity. *Small Ruminant Research*, 49, 257-274.
- Provenza, F. D., Villalba, J. J., Haskell, J., MacAdam, J. W., Griggs, T. C., Wiedmeier R. D. (2007). The Value to Herbivores of Plant Physical and Chemical Diversity in Time and Space. *Crop Science*, 47, 382–398.

- Quaresma, M.; Nóvoa, M.; Monteiro, A.; Almeida, J.M.; Portas, M. (2005). A raça Asinina de Miranda. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100, 227-231.
- Reinemeyer, R. (2009). Controlling strongyle parasites of the horse: mandate for change, *Proceedings 55th Annual American Association of Equine Practitioners Convention*, 5-9 Dezembro (352-360). Acedido em Setembro, 2013, <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2009/z9100109000352.pdf>
- Ribeiro, L.B. (2008). *Uso dos n-alcanos em comparação ao método convencional para determinar a digestibilidade de nutrientes de fenos em equinos*. Maringá, Brasil: Universidade Estadual de Maringá – Centro de ciências agrárias.
- Robertson, J.B., Van Soest, P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human foods. In: *The Analysis of Dietary Fiber*. W.P.T. James and O. Theander (Eds., 123-158). New York: Marcell Dekker.
- Romero, H.Q., 1990. *Parasitologia*, Editorial Limusa, 4ed. México.
- Ronchi, B., Nardone, A. (2003). Contribution of organic farming to increase sustainability of Mediterranean small ruminants livestock systems. *Livestock Production Science*, 80, 17-31.
- Roumet, C., Picon-Cochard C., Dawson, L.A., Joffre, R., Mayes R., Blanchard A., Brewer, M.J. (2006). Quantifying species composition in root mixtures using two methods: near-infrared reflectance spectroscopy and plant wax markers. *New Phytologist*, 170, 631–638.
- Rutagwenda, T., Lechner-Doll, M., Schwartz, H.J., Schultka, W., von Engelhardt, W. (1990). Dietary preference and degradability of forage on a semiarid thornbush savannah by indigenous ruminants, camels and donkeys. *Animal Feed Science and Technology*, 31, 179-192.
- Santos, B.R.C. (2010). Comportamento de Patoreio, *Revista electrónica de Veterinária* 1695-7504, 11, nº4. Acedido em Outubro 20, 2013, disponível em <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040410/041005.pdf>
- Scantlebury, C.E., Peachey, L., Hodgkinson, J., Matthews, J.B., Trawford, A., Mulugeta G., Tefera, G., Pinchbeck, G.L. (2013). Participatory study of medicinal plants used in the control of gastrointestinal parasites in donkeys in Eastern Shewa and Arsi zones of Oromia region, Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 9, 179, 1-12.
- Smith, D. G. (1999). *The impact of grazing time allowance on the dry matter intake and foraging behavior of cattle and donkeys managed under traditional African grazing systems*. Ph. D. Thesis. Edimburg: Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edimburg.
- Smith, D.G.; Pearson, R.A. (2005). A review of the factors affecting the survival of donkeys in semi-arid regions of sub-Saharan Africa. Special issue: nutrition and health of donkeys in the tropics. *Trop. anim. Health Prod.*, 37, Suppl. 1, 1-19.
- Smith, D.; Wood, S. (2008). *Nutricion*, In Svendsen, E.D. (ed.), *The Professional Handbook of the Donkey*, (4th Ed.), (pp.10-27). London: Whittet Books.
- Sotiraki, S.T., Badouvas, A.G., Himonas, C.A. (1997). A survey on the prevalence of internal parasites of equines in Macedonia and Thessalia – Greece. *Journal of Equine Veterinary Science*, 17 (10), 550-552.

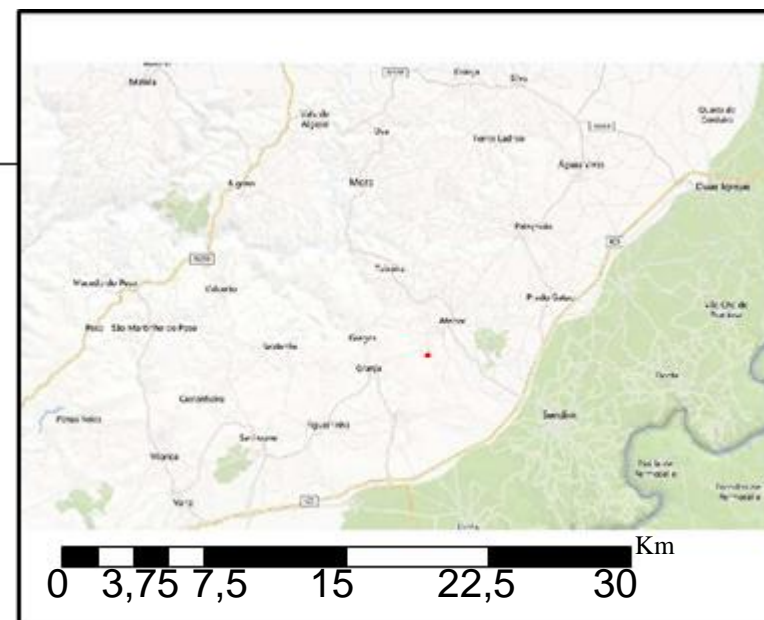
- Soulsby, E.J.L. (1986). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. (4ªEd.). UK, Londres: Baillière Tindall.
- Sousa, S., Martins, S., Quaresma, M., Madeira de Carvalho, L.M. (2005). Estudo parasitológico em Asininos da Raça de Miranda. *IX Congresso Ibérico de Parasitologia*, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 25 a 28 de Outubro de 2005. *Acta Parasitológica Port*, 2 pp. (Com. Oral)
- Sousa, S. E. R. (2009). *Métodos de coprologia e sua aplicação ao diagnóstico do parasitismo por estrongilídeos dos asininos*, Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica – aula teórico-prática. Coimbra: Escola Universitária Vasco da Gama.
- Sousa, S., Rodrigues J., Nóvoa M., Mora S., Paiva R., Madeira de Carvalho L.M. (2010). Parasitismo intestinal numa população de asininos (*Equus asinus*) no nordeste de Portugal, regularmente desparasitada. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 2010, nº 17, 1-9.
- Sousa, S., Nóvoa, M., Paz Silva, A., Madeira de Carvalho, L.M. (2012). Parasite control in Miranda Donkeys as a way of keeping animal welfare. In Saastamoinen, M., Fradinho, M.J., Santos, A.S., Miraglia, N.A (Eds.), *Forages and grazing in horse nutrition, EAAP publication No.132*, pp. 425-432. Holanda: Wageningen Academic Publishers.
- Sousa, S., Nóvoa, M., Mora, S., Paz Silva, A., Madeira de Carvalho, L.M. (2013). Gastrointestinal parasitism in Miranda do Douro donkey breed between 2005 and 2012 – Results of a deworming strategy every six months versus a selective deworming on a quarterly basis. *XVIII Congresso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA), Gran Canaria, 17-20 Setembro 2013, CO-EP.4*, pp. 86. (Com. Oral).
- Süss, K., Schwabe, A. (2007). Sheep versus donkey grazing or mixed treatment: results from a 4-year experiment in armerio-festucetum trachyllae sand vegetation. *Phytocoenologia*, 37, 135-160.
- Takele, B., Nibret, E. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminthes of donkeys and mules in and around Bahir Dar. *Ethiopia, Ethiop. Vet.J.*, 17(1), 13-30.
- Taylor, F. (1999). *Nutrición*. In Svendsen, E.D. (ed.) *Manual Profesional del Burro*, (3ª Ed.), (pp.81-93). Londres: Whittet Books.
- Traversa, D., Klei, T.R., Iorio, R., Paoletti, B., Lia, R.P., Otranto, D., Sparagano, O.A.E., Giangaspero, A. (2007). Occurrence of anthelmintic resistant equine cyathostome populations in central and southern Italy. *Preventive veterinary medicine*, 82, 314-320.
- Trawford, A.F., Burden, F.A., Hodgkinson, J. (2005). Suspected moxidectin resistance in cyathostomes in two donkey herds at The Donkey Sanctuary, UK. *Proceedings 20th International Conference World Association for Advanced Veterinary Parasitology*, 20 (196).
- Trawford, A., Mulugeta, G. (2008). *Parasites*. In Svendsen, E.D. (ed.), *The Professional Handbook of the Donkey*, (4th Ed.), (pp.82-110). London: Whittet Books.

- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J. (1986). *Diagnóstico de las helminthiasis por medio del examen coprológico*. (2ª Ed.). Belgium: Janssen Research Foundation, Beerse.
- Uslu, U., Guçlu, F. (2007). Prevalence of endoparasites in horses and donkeys in Turkey. *Bull Vet. Inst. Pulawy*, 51, 237-240
- Urquhart, G.M., Amour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. ; Jennings, F.W. (1996). *Veterinary Parasitology*. (2ª Ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Vieira, J.; Fernandes, A.; Bernardo, A.; Martins, V.; Moreira, N. (2000). Os lameiros e a sustentabilidade dos sistemas de produção agro-pecuários de montanha em Trás-os-Montes. (pp.12) In: *II Congresso de Estudos Rurais – “Periferias e Espaços Rurais”, Angra do Heroísmo – Açores*, 29 de Setembro a 3 de Outubro (publicado em CR-ROM – tema Ilhas, Montanhas e Outros Territórios).
- Van Soest, P.J. (1982). Nutritional ecology of the ruminant. *O and B Books*, Corvallis
- Vouzela, C.F.M. (2002). *Validação dos n-alcanos como marcadores em herbívoros*. Tese de Dissertação de Doutoramento. Angra do Heroísmo: Universidade dos Açores – Departamento de ciências agrárias.
- Waller, P.J., Bernes, G., Thamsborg, S.M., Sukura, A., Richter, S.H., Ingebrigtsen, K., Hoglund, J. (2001). Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic Countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. *Acta vet. Scand.*, 42, 31-44.
- Waller, P.J., Thamsborg, M. (2004). Review: Nematode control in ‘green’ ruminant production systems. *Trends in parasitology*, 20(10), 493-497.
- Wells, D.; Krecek R.C.; Wells M.; Guthrie A.J.; Lourens J.C. (1998). Helminth levels of working donkeys kept under different management systems in the Moretele 1 district of the North-West Province, South Africa. *Veterinary Parasitology*, 77, 163-177.
- Wood, S.J., Smith, D.G., Muir, C.J., Cuddeford, D. (2005). Seasonal variation of digestible energy requirements of mature donkeys in the UK. In: *Proceedings Equine Nutrition Conference* (250-259), Hanover, Germany.
- Wood, S. (2010). *Some factors affecting the digestible energy requirements and dry matter intake of mature donkeys and a comparison with normal husbandry practices*. Ph. D. Thesis. Edimburg: University of Edimburg.
- Wood, S.J., Smith, D.G., Morriss, C.J., Cuddeford, D. (2012). The effect of pasture restriction on dry matter intake of foraging donkeys in the United Kingdom. In Saastamoinen M. Fradinho, M.J., Santos, A.S., Miraglia, N. (eds.) *Forages and grazing in horse nutrition*, AAP publication No. 132, 163-175, Holanda: Wageningen Academic Publishers.
- Woodward, S.L., Ohmart, R.D. (1976). Habitat use and fecal analysis of feral burros (*Equus asinus*), Chemehuevi Mountains, California, 1974, *Journal of Range Management*, 29, (6), 482-485.

Anexo 1 – Localização da área de estudo



Legenda: ■ Área de Estudo



Anexo 2 – Lista da vegetação natural identificada no lameiro em estudo, segundo a taxonomia e nome comum

Ordem	Família	Género	Espécie	Nome Comum
Poales	Poaceae	<i>Avena</i>	<i>Avena</i> sp.	Aveia
		<i>Briza</i>	<i>Briza</i> sp.	Bole-bole-maior, Quilhão-de-galo, Chocaleira-maior
		<i>Bromus</i>	<i>Bromus</i> sp.	“Espiguilla de burro”, Bromo-cevada, Bromo-doce, Espadana, Fura-capa-menor, Pasto valcheta
		<i>Calamagrostis</i>	<i>Calamagrostis</i> sp.	-
		<i>Cynosurus</i>	<i>Cynosurus</i> sp.	Rabo-de-cão, Rabo-de-cão-empenachado, Rabo-de-macaco, Rabo-de cão; Rabo-de-cão-erigado
		<i>Dactylis</i>	<i>Dactylis glomerata</i> L.	Panasco, pé-de-galo, Dactila, Dactilo-comum, Erva canina das areas
		<i>Lolium</i>	<i>Lolium</i> sp.	Azevém-perene, erva-febra, Reigrasse dos ingleses
Fabales	Fabaceae	<i>Agrostis</i>	<i>Agrostis</i> sp.	Barbas-de-raposa, Erva-feno, Erva-fina, Linho-de-raposa, agrostis
		<i>Anthyllis</i>	<i>Anthyllis</i> sp.	-
		<i>Lathyrus</i>	<i>Lathyrus</i> sp.	-
		<i>Ononis</i>	<i>Ononis</i> sp.	-
		<i>Trifolium</i>	<i>Trifolium pratense</i> L.	pé-de-lebre, trevo-comum, trevo-dos-prados, trevo da ribeira, trevo-roxo, trevo-violeta
			<i>Trifolium repens</i> L.	Trevo-branco, Trevo-coroa-de-rei, Trevo-da-holanda, Trevo-ladino, Trevo-rasteiro
		<i>Vicia</i>	<i>Vicia</i> sp.	Ervilhaca

		<i>Cytisus</i>	<i>Cytisus</i> spp.	Giesta
Lamiales	Plantaginaceae	<i>Plantago</i>	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Lingua de ovelha
	Lamiaceae	<i>Teucrium</i>	<i>Teucrium scorodonia</i> L.	Escorodónia, Salva-bastarda, Salvia-bastarda
		<i>Clinopodium</i>	<i>Clinopodium vulgare</i> L.	clinopódio, zópiro
	Oleaceae	<i>Fraxinus</i>	<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl subsp. <i>angustifolia</i>	Freixo, Freixo-comum, Freixo-das-folhas-estreitas
Piperales	Aristolochiaceae	<i>Aristolochia</i>	<i>Aristolochia paucinervis</i> Pomel	Erva-bicha, Aristolóquia, Aristolóquia-fibrosa, Aristolóquia-longa, Erva-bicha, Erva-bicha-dos-hervanários, Estolóquia, Estrelamim, Pistolóquia
Rununcales	Rununculaceae	<i>Rununculus</i>	<i>Ranunculus</i> sp.	Botão-de-oiro; Botão-de-ouro
Apiales	Apiaceae	<i>Tapsia</i>	<i>Thapsia villosa</i> L.	Tápsia, turbit-da-terra, canafrecha, canavoura, tápsia-peluda
		<i>Tordylium</i>	<i>Tordylium maximum</i> L.	-
		<i>Chaerophyllum</i>	<i>Chaerophyllum hirsutum</i> Roseum	“perejil de burro”
Asterales	Asteraceae	<i>Carduus</i>	<i>Carduus tenuiflorus</i> Curtis	Cardo, Cardo-anil, Cardo-azul
		<i>Taraxacum</i>	<i>Taraxacum officinale</i> Wiggers	Dente-de-leão
		<i>Hypochaeris</i>	<i>Hypochaeris</i> sp.	Almeirão; Orelha-de-gato
Mapighiales	Linaceae	<i>Linum</i>	<i>Linum bienne</i> Mill	Linho-bravo, Linho-de-inverno, Linho-galego
			<i>Linum catharticum</i> L.	Linho-purgante
		Hypericaceae	<i>Hypericum</i> sp.	Erva de S- João, Hipericão bravo
	Salicaceae	<i>Populus</i>	<i>Populus alba</i> L.	Álamo-alvar; Álamo-branco; Amieiro-branco; Choupo-branco; Faia-branca
Rosales	Rosaceae	<i>Sanguisorba</i>	<i>Sanguisorba</i> sp.	Pimpinela
		<i>Potentilla</i>	<i>Potentilla reptans</i> L.	Cinco-em-rama; Potentila; Potentilha; Quinquéfólio; Tormentilha

		<i>Prunus</i>	<i>Prunus</i> sp.	Macieira silvestre
		<i>Ulmus</i>	<i>Ulmus</i> L.	Olmo, ulmeiro, negrilho
		<i>Crataegus</i>	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	Pilriteiro, espinheiro-alvar, branca-espinha
		<i>Rubus</i>	<i>Rubus</i> sp.	Silvas
		<i>Rosa</i>	<i>Rosa</i> sp.	Roseira-brava, Rosa-canina, Rosa-de-cão, Roseira, Roseira-brava, Roseira-de-cão, Roseira-silvestre, Silva-macha, Silvão
Asparagales	Asparagaceae	<i>Scilla</i>	<i>Scilla verna</i> Huds.	-
	Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	<i>Allium</i> sp.	Chalotinhas-do-gerês, sevas
Caryophyllales	Caryophyllaceae	<i>Stellaria</i>	<i>Stellaria graminea</i> L.	Morugem
		<i>Petrorhagia</i>	<i>Petrorhagia nanteuilii</i> (Burnat) P.W.Ball e Heywood	Petrorragia-do-nanteil
Geraniales	Geraniaceae	<i>Geranium</i>	<i>Geranium molle</i> L.	Bico-de-pomba-menor, Coentrinho
Fagales	Fagaceae	<i>Quercus</i>	<i>Quercus robur</i> L.	Carvalho-roble, Carvalho-alvarinho
			<i>Quercus ilex</i> L.	Azinheira
			<i>Quercus faginea</i> Lam.	Cerquinho
			<i>Quercus pyrenaica</i> Wild.	Carrasco
Dipsacales	Caprifoliaceae	<i>Lonicera</i>	<i>Lonicera</i> sp.	Madressilva
Brassicales	Brassicaceae	<i>Capsella</i>	<i>Capsella bursa pastoris</i> (L.) Medik.	Bolsa-de-pastor, Erva-do-bom-pastor
Solanales	Convolvulaceae	<i>Convolvulus</i>	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Corriola; Corriola-campestre; Corriola-mansa; Erva-garriola; Estende-braços; Engatateira; Garriola; Trepá-trepa; Verdeselha; Verdezelha; Verdisela; Verdiselha
Gentianales	Rubiaceae	<i>Galium</i>	<i>Galium Aparine</i> L.	Amor-de-hortelão, Erva-peganhosa, Pegamaço, Pegamassa, Rapa-saias, Raspa-língua

Anexo 4 – Metodologia das análises químicas dos alimentos e fezes

1. Determinação da Matéria Seca (105°C) e Matéria Orgânica/cinzas	
Material:	– Metodologias:
<ul style="list-style-type: none"> • Recipientes de plástico com tampa amovível devidamente identificados • Cápsulas de porcelana • Luvas de borracha • Bata • Estufa a T^a constante • Excisador • Mufla • Tenaz longa • Tabuleiros • Moinho crivo de 1-2 mm • Balança 	A) Método para a determinação da Matéria seca: <ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar as cápsulas numa estufa a 105°C. 2. Deixar arrefecer no excisador e posteriormente realizar a pesagem da cápsula. 3. Pesagem de 2,5g de amostra para uma cápsula. 4. Secagem do resíduo em estufa a 105°C e deixar de um dia para o outro. 5. Colocar no excisador, deixar arrefecer e pesar a cápsula + resíduo seco
	B) Método para a determinação da MO/cinza: <ol style="list-style-type: none"> 1. Submeter a cápsula + resíduo seco na mufla a 550°C, durante 3 horas, para fazer cinza. 2. Colocar numa estufa a 105°C e deixar de um dia para o outro. 3. Colocar no excisador, deixar arrefecer e pesar a cápsula + cinza.

2. Determinação da Proteína Bruta	
Material:	Método:
<ul style="list-style-type: none"> • Bata • Luvas de borracha • Máscara • Digestor • Destilador • Titulador • Balança analítica • Tubos • Pinça • Papel vegetal • Goblés • Doseadores automáticos 	Reagente – Digestão: 1 pastilha de selénio (99,9% de sulfato de potássio e 0,1% de selénio) e 5mL de H ₂ SO ₄ p.a.
	Destilação: 15mL de H ₂ O destilada, NaOH a 40%, H ₃ BO ₃ a 4%, H ₂ SO ₄ 0,1N Pesar 2Kg de NaOH e dissolver, num balão de 5L, com agitação. Após o arrefecimento da solução preencher até ao traço. <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 200 gr de H₃BO₃ e dissolver com agitação e preencher até ao traço. 2. Medição de 5,601mL de H₂SO₄ para 2L de solução e confirma-se a sua titulação com o tetraborato de dissódico decahidrato p.a (Na₂B₄O₇ 10 H₂O). 3. Pesar 0,1g de tetraborato de dissódico decahidrato num goblés, e adicionar 20mL de H₂O destilada. 4. Agitar e adicionar umas gotas do indicador vermelho de metilo (solução: 300 gr de vermelho de metilo para 100 mL

de etanol).

5. Titular.

Estes dois reagentes são adicionados automaticamente pelo aparelho de destilação.

Digestão: Pesagem em duplicado de 2g de amostra moída e seca em tubos. Adicionar a pastilha de selênio e 5mL de H_2SO_4 p.a. e agitar. Colocar no digestor durante 1h a $420^\circ C$, e deixar arrefecer.

Destilação: Colocar a amostra anterior arrefecida no destilador cerca de 4min20seg e adicionar H_2O destilada, NaOH 40% e H_3SO_3 a 4%.

Realizar a titulação com H_2SO_4 0.1 N.

3. Determinação dos componentes da parede celular

Material:	Método:
<ul style="list-style-type: none">• Luvas de borracha• Bata• Mufla• Placas de aquecimento com sistema de refrigeração (Labconco)• Placa de aquecimento com agitação• Balança analítica• Estufa• Excisador• Bomba de vácuo• Berzélius com capacidade de 500mL• Cadinhos de porosidade 1, com capacidade de 50 mL• Balões volumétricos de várias capacidades• Cápsulas de porcelana• Doseador	<p>Método – NDF:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Preparação da Solução NDF (2 Litros): 37,22 g EDTA (titriplex III) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) + 13,62 g BORAX (tetraborato e sódio) ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) + 60,00 g Sulfato lauril sódico ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) + 20,00 mL Etilenoglicol ou etoxietanol ou éter monoetílico $C_2H_6O_2$ (para controlar a formação de espuma) + 9,12 g Hidrogeno fosfato de sódio anidro Na_2HPO_4 (dissolvido anteriormente em água)2. Pesar 0,5 g de amostra moída num crivo de 1mm, seca em estufa a $65^\circ C$, para berzélius com capacidade de 500 mL.3. Juntar 50 mL de solução detergente à T^a ambiente.4. Levar à ebulição rapidamente, em 5-10 min, e reduzir o aquecimento logo que a ebulição se inicie, para evitar a formação de espuma. Manter durante 1 h e após transcorrer este tempo desligar o aquecimento.5. Filtrar em cadinho de porosidade 1, utilizando uma sucção fraca.6. Lavar os resíduos com duas porções de água quente e transferir os cadinhos para a unidade a frio. Lavar os resíduos duas vezes com acetona.7. Colocar os cadinhos numa estufa a $100^\circ C$ durante a noite e no dia seguinte colocar no excisador para arrefecer, durante 20 min e proceder à pesagem.8. Levar os cadinhos à mufla a $500^\circ C$ durante 2h30min, transferi-los para a estufa a $100^\circ C$ durante 1h e em seguida arrefecê-los no excisador durante 20min e pesar. <p>Método – ADF:</p>

- automático
- Papel vegetal
 - Varetas
 - EDTA (titriplex III)
($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$)
 - BORAX (tetraborato e sódio)
($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)
 - Sulfato lauril sódico
($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
 - Etilenoglicol ou etoxietanol ou éter monoetílico $C_2H_6O_2$
(para controlar a formação de espuma)
 - Hidrogeno fosfato de sódio anidro
 Na_2HPO_4
 - Acetona CH_3CO
 - Água

1. **Preparação da solução ADF:** Dissolver num balão de 5L com água destilada 140,025 mL de H_2SO_4 , 100 gramas de N-cetil-N, N, N-trimetilamônio brometo ($C_{19}H_{14}BrN$).
2. Pesar 0,5 g de amostra moída num crivo de 1mm, seca em estufa a 65°C, para berzélius com capacidade de 500 mL.
3. Juntar 50 mL de solução detergente à Tª ambiente.
4. Levar à ebulição rapidamente, em 5-10 min, e reduzir o aquecimento logo que a ebulição se inicie, para evitar a formação de espuma. Manter durante 1 h e após transcorrer este tempo desligar o aquecimento.
5. Desligar o aquecimento e deixar repousar durante 30-60 segundos.
6. Filtrar em cadinho de porosidade 1, utilizando uma sucção fraca.
7. Lavar os resíduos com duas porções de água fervente. Transferir os cadinho para a unidade a frio.
8. Levar os cadinho para a estufa a 105°C durante a noite. Arrefecimento no excisador durante 20 min e pesagem.

Método – ADL:

1. **Preparação do H_2SO_4 a 72% para ADL:** Num balão de capacidade de 4L, pese 816g de H_2O destilada. Noutro recipiente, pese 2452g de H_2SO_4 comercial e seguidamente colocar no balão aos poucos e poucos, de modo a ter atenção às altas temperaturas atingidas neste ponto.
2. Com os mesmo cadinhos com o resíduo anterior (do ADF), colocam-se em cima de cápsulas.
3. Embebem-se os cadinho com H_2SO_4 a 72% durante 3 h. Proceder ao involucramento de vez em quando com uma vareta.
4. Após as 3h, filtrar com auxílio de vácuo e lavar com cerca de 150 mL de água destilada fervente.
5. Colocar os cadinho na estufa a 105°C durante uma noite, com posterior arrefecimento no excisador durante 20min.
6. Proceder à pesagem.
7. Colocar os cadinho na mufla a 500°C durante 2h30min, transferir para a estufa a 105°C durante 1h, e em seguida arrefecê-los no excisador durante 20min.
8. Proceder à pesagem.

4. Extração de alcanos em amostras de fezes e de alimento

Material:	Método:
<ul style="list-style-type: none"> • Bata • Luvas • Capsulas • Tubos de pyrex com rolha • Termobloque • Agitador • Pipeta de pasteur • Frascos de vidro 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 0,2g (fezes) ou 0,5g (alimento) de amostra, para tubos de pyrex de 20x100mm com rolha de rosca. 2. Adicionar 300μL (cerca de 220mg) de uma solução de Standard Interno Alcanos e pesar com precisão. Deixar tapado. 3. Juntar 3 ou 6 mL KOH 1M em etanol, para amostras de fezes ou alimento, respectivamente. Fechar bem com a rolha. 4. Colocar no termobloque a 90°C durante 16h. 5. Juntar 3 (fezes) ou 4(alimento) mL de heptano e 0,8 (fezes) ou 1,2 (alimento) mL de água desionizada. Fechar e agitar energicamente. 6. Aquecer no termobloque a 65°C (cerca de 20 min). 7. Ajudar com o agitador a separar as duas fases (cerca de 10 min), extrair a fase superior com uma pipeta de Pasteur e passar para um frasco de vidro. 8. Juntar outros 3 (fezes) ou 4 (alimento) mL de heptano e repetir a extração e evaporação no mesmo frasco. Voltar a agitar, pousar e retirar da evaporação a 65°C. 9. Dissolver em 1mL de heptano, aquecer a 70°C numa placa plana no termobloque e filtrar por uma coluna de sílica-gel de 2 mL de volume. Lavar o frasco com outros 1 mL de heptano e juntar à coluna. 10. Lavar a coluna com 3mL + 2mL de heptano. 11. Recolher o filtrado no mesmo frasco. 12. Evaporar a 65°C.

Anexo 5 – Metodologia das técnicas coprológicas

1. Técnica de McMaster segundo o método Thienpont, <i>et al</i>, 1986 e Madeira de Carvalho, 2001	
Material:	Método:
<ul style="list-style-type: none"> • Luvas • Seringa calibrada para as 2 gramas de fezes • Copo de plástico • Solução saturada (açúcar) • Varetas de vidro • Passador • Funil • Câmaras de McMaster • Microscópio • Pipetas descartáveis 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Homogeneizar 2 gramas de fezes com 28mL de solução saturada (açúcar). 2. Realizar a filtração da solução com um passador para um copo. 3. Com uma pipeta descartável, preencher a câmara de McMaster com a mistura filtrada. 4. Aguardar aproximadamente 15-20 min para haver adesão dos ovos às paredes da câmara. 5. Observar ao microscópio.

2. Coprocultura descrita por Roberts & O'Sullivan (1950), adaptada por Madeira de Carvalho, 2001	
Material:	Método:
<ul style="list-style-type: none"> • Luvas • Copos descartáveis devidamente identificados • Balança • Colher e Varetas de vidro • Papel de alumínio • Estilete • Tabuleiros • Água • Estufa de modelo • Placas de Petri • Tubos de ensaio identificados + suporte • Microscópio • Homogenizador • Pipetas de plástico de 1 e 3 mL • Lâminas e lamelas de 40 mm 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Homogeneizar a amostra de fezes num copo devidamente identificado. 2. Com uma vareta de vidro, perfurar a amostra até ao fundo do copo de modo a permitir a oxigenação das fezes. 3. Tapar o copo com uma folha de alumínio perfurada. 4. Colocar os copos num tabuleiro semi preenchido com água, de modo a garantir humidade ambiente durante o cultivo. 5. Colocar o tabuleiro com os copos, numa estufa à temperatura de 26-27°C durante 14 dias. 6. No último dia retirar da estufa os tabuleiros com os copos e a estes últimos, encher com água. 7. Tapar o copo com uma placa de petri e inverter o conjunto (colocar depois mais um pouco de água na placa de Petri). 8. Recolher a água das placas de Petri 24h depois para tubos de ensaio.

Anexo 6 – Chave dicotómica de identificação de alguns nematodes

Madeira de Carvalho, L.M., Fazendeiro, M.I.; Afonso-Roque, M.M. (2008). Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos. 3. Conclusões, perspectivas futuras e proposta de chave de identificação de alguns nemátodes gastrintestinais mais comuns dos equídeos em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15 (1/2), 59-65.

1.

- A. Larva sem bainha2.
- B. Larva com bainha3.

2.

- A. Esófago rabditiforme (com bulbo), presença de machos, fêmeas e ovos

Nemátóide De Vida Livre

- B. Esófago filariforme, de tamanho superior a 1/3 do comprimento do corpo.
Cauda la larva termina em forma de “v” pequeno.

Strongyloides westeri

3.

- A. Cauda da bainha muito curta: 80 a 115 μm do ânus à extremidade posterior da bainha, mas sem forma de chicote.
Comprimento médio de 738,1 μm

Trichostrongylus axei

- B. Cauda da bainha comprida (> 175 μm) em com forma de chicote4.

4.

- A. Larvas de tamanho médio com 6 a 9 células intestinais, com comprimento total médio de 773.3 - 886 μm 5.
- B. Larvas de tamanho pequeno a grande com mais de 9 células intestinais, com comprimento total médio de 730,7 – 991,7 μm8.

5.

- A. Larvas de tamanho médio, com 8 células intestinais com organização e forma bem definidas, com comprimento total médio de 812 – 848 μm6.
- B. Larvas de tamanho médio a grande, com 6-9 células intestinais Sem organização e forma definidas, com comprimento total médio de 773,3 – 886 μm7.

6. *Cyathostomum*, sensu lato tipos A, B, C e D

- A.** Larvas de dimensão média com 8 células intestinais, em que as duas primeiras (triangulares ou rectangulares) formam uma fila dupla e as restantes seis (trapezoidais ou rectangulares) formam uma fila única, com comprimento total médio de 811,9 μm

***Cyathostomum* spp. tipo A (2+6):**

***Cylicocyclus insigne*, *C. nassatus*, *C. radiatus*,
Cylicostephanus minutus, *C. poculatus*, *C. longibursatus* (?),
Cyathostomum catinatum, *C. pateratum***

- B.** Larvas de dimensão média com 8 células intestinais triangulares ou pentagonais arranjadas em fila dupla, comprimento total médio 828,2 μm

***Cyathostomum* spp. tipo B (4+4):**

***Cylicostephanus brevicapsulatus*, *C. ultrajectinus*,
*Cylicodontophorus bicoronatus***

- C.** Larvas de dimensão média a grande com 8 células intestinais, em que as quatro primeiras formam uma fila dupla (pentagonais, triangulares ou rectangulares) e as restantes quatro (trapezoidais) estão arranjadas em fila única, comprimento total médio 847,8 μm

***Cyathostomum* spp. tipo C (2+2+4):**

Cylicostephanus calicatus*, *C. hybridus*, *C. longibursatus

- D.** Larvas de dimensão média a grande com 8 células intestinais em fila única com forma trapezoidal ou triangular, com comprimento total médio de 842,8 μm

***Cyathostomum* spp. tipo D:**

espécies não determinadas

7.

- A.** Larvas de pequena dimensão com 6 células intestinais triangulares e/ou trapezoidais, com arranjo diverso, em fila dupla ou única, < comprimento total médio 773,3 μm

***Cyathostomum* spp. tipo E:**

espécies não determinadas

- B.** Larvas de média dimensão com 7 células intestinais triangulares e trapezoidais alongadas. Arranjo diverso, 2-4 células em fila dupla e as restantes em fila única ou arranjo misto. Comprimento total médio 824,2 μm

***Cyathostomum* spp. tipo F:**

espécies não determinadas

- C. Larvas de média a grande dimensão com 8 células intestinais triangulares e/ou rectangulares (alongadas e estreitas), trapezoidais (porção distal), arranjo diverso, comprimento total médio 847,8 μm

***Cyathostomum* spp. tipo G:**
espécies não determinadas

- D. Larvas de grande dimensão com 9 células intestinais triangulares alongadas, as primeiras 6 em fila dupla e as restantes em fila única, > comprimento total médio 886 μm

***Cyathostomum* spp. tipo H:**
espécies não determinadas

8.

- A. Larvas com 12 células intestinais arranjadas em fila dupla (células com forma rectangulares e pentagonal), 6-10 células emparelhadas e as restantes em fila única (trapezoidal e triangular), com comprimento total médio 730, 7

Gyalocephalus capitatus

- B. Larvas com mais de 12 células intestinais9.

9.

- A. Larvas com 16 células intestinais10.

- B. Larvas com mais de 16 células intestinais12.

10.

- A. Larvas de dimensão média (comprimento médio 785,7 μm e largura média de 27,6 μm), com 16 células intestinais rectangulares e pentagonais, com uma proporção corpo da larva/porção distal (cl/pd) = 2,1:1

***Poteriostomum* spp.**

- B. Larvas de dimensão grande11.

11.

- A. Larvas de grande dimensão (comprimento médio 991,7 μm e largura média de 34,5 μm), com intestino longo (415 μm) e com células grandes, distintas, de forma triangular, por vezes pentagonais alongadas, proporção cl/pd=2,4:1

Oesophagodontus robustus

- B. Larvas de grande dimensão (comprimento médio 862,4 μm e largura média 29,2 μm), com células rectangulares (células proximais em fila dupla), pentagonais e triangulares (células distais em posição intermédia ou com uma única célula terminal), proporção cl/pd= 1,8:1

Craterostomum acuticaudatum

- C. Larvas de grande dimensão (comprimento médio de 907 μm e largura média 30,1 μm), com células proximais retangulares alongadas e as restantes pentagonais, as duas células distais assimétricas, uma com metade do comprimento da outra mas com terminação ao mesmo nível, proporção cl/pd= 1,7:1

Triodontophorus serratus

- D. Larvas de grande dimensão e finas (comprimento médio de 901 μm e largura média de 18,3 μm) células intestinais pouco diferenciadas, transição pouco distinta entre o esófago e o intestino, cauda da larva com um lobo na extremidade, cauda da bainha curta, proporção cl/pd= 4,1:1

Strongylus equinus

12.

- A. Larvas com 18-20 células intestinais.....13.
B. Larvas com mais de 20 células intestinais14.

13.

- A. Larvas de pequena a média dimensão, finas (comprimento médio de 788,5 μm e largura média de 22,5 μm), com células intestinais triangulares e estreitas e alongadas, mal definidas, esófago curto, proporção cl/pd= 2,2:1

Strongylus edentatus

- B. Larvas de média a grande dimensão, grossas (comprimento médio de 834,2 μm e largura média de 28,4 μm), com células intestinais pentagonais (mais frequentes), rectangulares e triangulares (células distais, justapostas ou em posição intermédia), esófago longo (cerca de 1/3 do comprimento do cl), proporção cl/pd=2,1:1

Triodontophorus spp.**(excepto *Triodontophorus serratus* – ponto 11C)**

14.

- A. Larvas de grande dimensão e grossas (comprimento médio de 935,6 μm e largura média de 32,1 μm), com células intestinais pentagonais e triangulares, bem definidas e com coloração muito escura, esófago curto, proporção cl/pd= 2,8:1

Strongylus vulgaris

Anexo 7 – Distribuição da totalidade do tempo gasto pelos animais (%), segundo as zonas do lameiro no fim do estudo.

